



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Desarrollo de un sistema
automático como una propuesta
alternativa para la identificación y
cuantificación de huevos de
helmintos en agua residual**

TESIS

Que para obtener el título de

Ingeniero Civil

P R E S E N T A

Gabriela Edith Campos Luna

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Catalina Maya Rendón



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DIVISIÓN DE INGENIERÍAS CIVIL Y GEOMÁTICA
COMITÉ DE TITULACIÓN
FING/DICyG/SEAC/UTIT/086/16

Señorita
GABRIELA EDITH CAMPOS LUNA
Presente

En atención a su solicitud me es grato hacer de su conocimiento el tema que propuso la profesora M.C. CATALINA MAYA RENDÓN, que aprobó este Comité, para que lo desarrolle usted como tesis de su examen profesional de INGENIERO CIVIL.

"DESARROLLO DE UN SISTEMA AUTOMÁTICO COMO UNA PROPUESTA ALTERNATIVA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS EN AGUA RESIDUAL"

- INTRODUCCIÓN
- I. ANTECEDENTES
- II. OBJETIVO GENERAL
- III. OBJETIVOS PARTICULARES
- IV. ALCANCES
- V. HIPÓTESIS
- VI. METODOLOGÍA
- VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS
- VIII. CONCLUSIONES
- RECOMENDACIONES
- BIBLIOGRAFÍA

Ruego a usted cumplir con la disposición de la Dirección General de la Administración Escolar en el sentido de que se imprima en lugar visible de cada ejemplar de la tesis el Título de ésta.

Asimismo le recuerdo que la Ley de Profesiones estipula que deberá prestar servicio social durante un tiempo mínimo de seis meses como requisito para sustentar Examen Profesional.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria a 9 de noviembre del 2016.
EL PRESIDENTE


M.I. GERMÁN LÓPEZ RINCÓN

GLR/MTH*gar.

DEDICATORIA

A mi mamá

Este logro más que mío es tuyo, ya que gracias a tu esfuerzo he podido llegar hasta donde estoy hoy. Mami sabes que siempre has sido el motor e inspiración de mi vida, gracias por tu apoyo incondicional, tu cariño y guía. Gracias a ti hoy alcanzo uno de los logros más grandes profesionalmente. Que te sientas orgullosa de mí es mi mayor recompensa. Te amo mami.

A mi papá

Por su gran ejemplo de superación y valioso apoyo. Gracias papa por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí. Te amo.

A mi familia

Padrinos gracias por ser mi segundos papas, procurarme y siempre cuidarme, les dedico este gran logro en mi vida porque representan personas muy importantes para mí. A mis primos. Abraham, Jorge y Miri muchas gracias por ser mis hermanos y mi ejemplo a seguir, los quiero mucho. A mi sobrinito, por ser un motivo para mejorar cada día y darte un buen ejemplo.

A mis amigos

Porque sin duda fueron lo mejor que la universidad me ha dejado. Carlos: gracias por alegrarme la vida y convertirme en una persona muy importante para mí, Sari: gracias por ser no solo mi mejor amiga sino mi compañera en todo momento, Erick verde: Gracias por las risas y el tiempo que disfrutamos juntos, Abril, Gus, Erick normal, Hermano, Sandy y todos aquellos que me brindaron su amistad a lo largo de estos años: gracias por vivir esta gran aventura conmigo. Todos los recuerdos los atesoro en mi memoria y saben que siempre los llevaré en mi corazón.

A la Facultad de Ingeniería de la UNAM

Por ser mi casa estos 4 años y medio, por darme experiencias inolvidables y una formación profesional y personal invaluable. Gracias UNAM por haberme permitido convertirme en un ser profesional en lo que tanto me apasiona.

A mis maestros

Por compartir su conocimiento técnico y experiencia profesional, gracias por hacer la gran labor de darnos una formación universitaria. Al Ing. Heriberto, Ing. Demeneghi, Ing. Mayverena, Ing. Takashi, Ing. Gallegos, Ing. Erick Castañeda, Ing. Margarita Puebla, agradezco haber tenido profesores con la calidad humana que tienen, gracias por ser instructores de vida y ayudarme a crecer en lo personal y profesional.

A Catalina Maya

Por no sólo ser una tutora, sino haberse convertido en una amiga, guía y ejemplo de persona. Gracias por tu paciencia, enseñanzas y consejos, ha sido un privilegio haber contado con tu guía y ayuda.

A Gustavo Velásquez

Gracias por toda tu ayuda y apoyo, sabes que esta tesis no hubiera sido posible sin ti. Gracias por acompañarme, aguantarme y hacerme reír en mis días en el Instituto.

To my dearest American Family

Pat and Loraine Martin, thank you very much for all the support and company you gave me in my time in Arizona. You are a symbol of kindness and generosity to me. I will never forget you.

A Dios

Por haberme permitido alcanzar este logro en mi formación profesional, por acompañarme en cada paso que doy y por darme la bendición de encontrar en este camino a maravillosas personas que me acompañaron y apoyaron a lo largo de estos años de estudio. Gracias Dios porque eres el pilar de mi vida y me esforzaré para que con tus bendiciones llene de amor y alegría mi propia vida y la de las personas a mi alrededor.

La pasión por lo que haces te hará entender que los límites son mentales.

RESUMEN

En la actualidad el uso del agua residual para riego agrícola es una práctica común que, no obstante el aporte benéfico a los cultivos, como nutrientes y materia orgánica, también, puede representar un riesgo importante a la salud de la población, ya que en ella se concentran, tanto en variedad como en cantidad, diferentes tipos de parásitos patógenos. Tal es el caso de los helmintos, gusanos parásitos de distribución mundial y de interés médico debido a las infecciones que ocasionan, razón por la cual desde 1989, la WHO estableció la normatividad internacional que regula el contenido de huevos de helmintos (etapa infectiva de su ciclo de vida) en el agua residual destinada para riego, ≤ 1 huevo/litro. Dada la importancia que estos parásitos representan, resulta imprescindible verificar el cumplimiento de los criterios que la mayoría de los países, México incluido, han adoptado. No obstante que a nivel mundial existen técnicas que permiten llevar a cabo la identificación y cuantificación de los huevos de helmintos, a través de etapas de limpieza, concentrado y separación de los huevos del resto de partículas que la muestra contiene, su última etapa involucra la observación directa al microscopio óptico por parte de un técnico experto. De esta forma el resultado final está sujeto a la expertise del analista quien la realiza, lo que constituye una importante fuente de error, incertidumbre o subjetividad del resultado final por: a) la poca o nula experiencia de analista para diferenciar estructuras similares a los huevos (tales como polen, esporas, burbujas, etc.), b) la alta cantidad de detritus o c) los tiempos excesivos de observación y fatiga. A causa de tal problemática, y tomando como preámbulo los estudios realizados en el campo de procesamiento de imágenes de microscopía, fue factible su aplicación para el desarrollo de un sistema automático capaz de identificar y cuantificar diferentes especies de huevos de helmintos en muestras de agua residual, el cual representa una alternativa confiable y rápida, sin la necesidad de contar con un técnico experto para su aplicación. El desarrollo del sistema automático involucró 4 etapas, mismas que comprendieron 1) la selección de 10 diferentes especies de huevos de helmintos de importancia médica y distribución mundial, 2) la generación de una base de datos de imágenes para la calibración del sistema, 3) la selección y diseño de algoritmos de procesamiento para el mejoramiento de las imágenes con el objetivo de permitir una adecuada segmentación, identificación y clasificación de los objetos de interés, y con base en sus características principales clasificarlos y 4) la validación del sistema, a través de los porcentajes de Sensibilidad (capacidad del sistema de clasificar correctamente a un huevo de helminto en la especie que corresponde) y de Especificidad (capacidad del sistema de clasificar correctamente un objeto cuando no se trata de un huevo), para tres diferentes clases de agua residual de acuerdo a su contenido de sólidos totales: a) Clase I, agua residual tratada con bajo contenido de sólidos totales, generada de un proceso terciario equivalente (< 15 mg/L ST), b) Clase II, agua residual tratada hasta un tratamiento secundario (> 15 mg/L ST, < 150 mg/L ST) y c) Clase III, agua residual sin tratamiento con un contenido > 150 mg/L ST. La validación, tanto a nivel nacional como internacional, del sistema automático desarrollado para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de agua residual, mostró porcentajes de Sensibilidad y Especificidad promedios del 97 y 96%, respectivamente, por lo que representa una herramienta real y confiable para los operadores de plantas de tratamiento de agua residual, mejora la eficiencia de la técnica analítica en diversas comunidades, lo que conduce a la reducción o eliminación de los riesgos a la salud que este tipo de parásitos representa.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	3
2.1	Parásitos en el agua residual.....	3
2.2	Helmintos	4
2.2.1	Generalidades	4
2.2.2	Clasificación.....	4
2.2.3	Mecanismos de transmisión	7
2.2.4	Distribución mundial	7
2.2.5	Helmintos de importancia médica	10
2.2.6	Ciclos de Vida	12
2.2.6.1	Nematodos	12
2.2.6.2	Cestodos.....	13
2.2.6.3	Trematodos	14
2.2.7	Huevos de Helmintos	15
2.3	Normatividad para el reúso de agua residual en la agricultura (Criterios internacionales: WHO; Criterios Nacionales: NOM-003-SEMARNAT-1997).....	17
2.4	Importancia de la evaluación de la calidad del agua residual para reúso agrícola.....	18
2.5	Técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos.....	18
2.5.1	Métodos físicos	18
2.5.2	Métodos indirectos	19
2.6	NMX-AA-113-SEMARNAT-1999 (NMX técnica tradicional para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos en agua).....	19
2.7	Debilidades de la técnica tradicional. Segunda etapa de las técnicas: identificación y cuantificación a través de la observación directa al microscopio.....	20
2.8	Experiencias en la aplicación de procesamiento de imágenes para la detección de estructuras biológicas.	20
3.	Objetivo general.....	22
4.	Objetivos particulares	22
5.	Alcances.....	22
6.	Hipótesis.....	22
7.	Metodología (materiales y métodos).....	23
7.1	Criterios para la selección de especies de huevos de helmintos	23

7.1.1	Nematodos: <i>Ascaris lumbricoides</i> (estadio fértil e infértil), <i>Toxocara canis</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , Uncinarias (<i>Ancylostoma duodenale</i> y <i>Necator americanus</i>).....	23
7.1.2	Cestodos: <i>Hymenolepis diminuta</i> , <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Taenia solium</i>	24
7.1.3	Trematodos: <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Fasciola hepatica</i>	24
7.2	Base de datos de imágenes de helmintos.....	24
7.3	Desarrollo de algoritmos del sistema automático para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos.....	28
7.3.1	Imagen original a color.....	28
7.3.2	Conversión de la imagen a escala de grises.....	29
7.3.3	Filtrado de difusión anisotrópica.....	30
7.3.4	Segmentación.....	31
7.3.4.1	Mediante umbralización local.....	31
7.3.4.1.1	Algoritmo de Sauvola.....	31
7.3.4.2	Mediante detección de bordes.....	33
7.3.4.2.1	Laplaciano de un Filtro Gaussiano.....	33
7.3.4.2.2	Umbralización del Laplaciano del filtro Gaussiano.....	34
7.3.4.3	Segmentación final.....	35
7.3.5	Transformada de Watershed.....	35
7.3.6	Filtros morfológico y de área.....	36
7.3.7	Obtención de características.....	37
7.3.7.1	Forma.....	38
7.3.7.1.1	Área:.....	38
7.3.7.1.2	Perímetro:.....	39
7.3.7.1.3	Excentricidad:.....	40
7.3.7.2	Textura.....	41
7.3.7.2.1	LBP.....	41
7.3.8	Clasificador.....	43
7.3.8.1	Clasificador KNN (k vecinos).....	43
7.3.9	Verificación de la clasificación.....	44
7.4	Preparación de muestras para la evaluación del sistema.....	44
8.	Resultados.....	48
8.1	Validación internacional.....	49
8.1.1	Validación en la Universidad de Nancy, Francia.....	50
8.1.2	Validación en la Pontifica Universidad Javeriana, Colombia.....	53

8.1.3	Validación en Brasil	53
9.	Conclusiones	55
10.	Recomendaciones	56
11.	Bibliografía	57
Anexo 1-	NMX-AA-113-SEMARNAT-1999	62
Anexo 2-	Diagramas de huevos de helmintos de importancia médica (Ayres, 1989).	78
Anexo 3-	Clasificación de calidades agua residual utilizadas para la validación del sistema.....	79

TABLA DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación de los helmintos de interés médico (Jiménez & Maya, 2007).....	6
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Ascaris lumbricoides</i> . Fuente: Uribarren, 2016	13
Figura 3.	Ciclo de vida del género <i>Taenia spp.</i> . Fuente: Uribarren, 2016	14
Figura 4.	Ciclo de vida <i>Schistosoma mansoni</i> . Fuente: García, 2012	15
Figura 5.	Diagrama de flujo del desarrollo del sistema automático	28
Figura 6.	Imagen a color original.....	29
Figura 7.	Imagen en escala de grises.....	30
Figura 8.	Imagen después de la aplicación del filtro anisotrópico	31
Figura 9.	Imagen binarizada por umbralización local (algoritmo de Sauvola)	32
Figura 10.	Imagen afectada por el filtro morfológico de cerradura.....	33
Figura 11.	Imagen después de la aplicación del filtro LoG.....	34
Figura 12.	Imagen umbralizada después de la aplicación del algoritmo LoG	34
Figura 13.	Imagen final resultante de la segmentación	35
Figura 14.	Imagen obtenida después de la aplicación del algoritmo Watershed	36
Figura 15.	Imagen con la aplicación del Filtro de área	37
Figura 16.	Imagen después de aplicado el algoritmo Watershed.	
Figura 17.	Imagen después de aplicados los filtros.....	37
Figura 18.	Adyacencia entre pixeles a) Fronteras b) Esquinas (Carcedo y Franco, 2004)	
Figura 19.	Conectividad 8.....	38
Figura 20.	Reglilla (los espacios pequeños equivale a 20 μm , mientras que los espacios más amplios equivalen a 100 μm).....	38
Figura 21.	Huevo de <i>Hymenolepis diminuta</i> con reglilla.....	39
Figura 22.	Huevo de <i>Fasciola hepatica</i> con reglilla	39
Figura 23.	Perímetro de huevo de <i>Hymenolepis diminuta</i> (izquierda) y <i>Schistosoma mansoni</i> (derecha)	40
Figura 24.	Ejemplificación de las excentricidades de un huevo de <i>Trichuris trichiura</i> (izquierda) y un huevo de <i>Taenia solium</i> (derecha).....	40
Figura 25.	Esquema de los pasos necesarios para obtener el valor de LBP de un pixel (García-Olalla & Alegre, 2013)	41
Figura 26.	Gráfica del comportamiento de la característica LBP8 para diferentes especies de huevos de helmintos	42
Figura 27.	Diagrama de flujo de una decisión teórica de un clasificador	43

Figura 28. Objeto clasificado como huevo del grupo de las Uncinarias (Hookworm en inglés)	44
Figura 29. Huevos de <i>Ascaris lumbricoides</i> clasificados correctamente.....	46
Figura 30. Basura clasificada como <i>Ascaris lumbricoides</i> fértil.....	46
Figura 31. Presencia de basura que es clasificada correctamente como "no huevo"	46
Figura 32. Imagen con presencia clara de un huevo de <i>Schistosoma mansoni</i> que no es detectado	47
Figura 33. Resultados de sensibilidad y especificidad del software para diversas clases de agua residual.....	49
Figura 34. Función de probabilidad de las características de los huevos de <i>Ascaris lumbricoides</i> observados en la validación: a) Diámetro, b) Área, c) Eje menor. Línea azul: datos observados, línea roja: datos de entrenamiento	50
Figura 35. División menor equivalente a 20 μm marcada con rojo	51
Figura 36 Comparación de características de huevos de <i>Ascaris lumbricoides</i> . a) Área, b) Perímetro, c) Eje menor, d) Diámetro. Línea morada: Imágenes de entrenamiento, línea roja: Imágenes Nancy escaladas, línea verde: imágenes Nancy no escaladas	52
Figura 37. Imagen obtenida en la Pontificia Universidad Javeriana	53
Figura 38. Huevo de <i>Hymenolepis nana</i>	54
Figura 39. Identificación de un huevo de <i>Hymenolepis nana</i> : antes de los ajustes de nivel de gris (izquierda), después de los ajustes (derecha).....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de helmintos y helmintiasis reportadas en diferentes regiones del mundo (Jiménez <i>et al.</i> , 2016).....	8
Tabla 2 Estimación de la población infectada por región. Fuente: Pullan <i>et al.</i> , 2014.....	9
Tabla 3 Frecuencia estimada de algunas parasitosis por helmintos intestinales en la República Mexicana en el año 2002 Fuente: Biagi, 2004.	10
Tabla 4 Síntomas y prevalencia de enfermedades causadas por helmintos Fuente: Biagi, 2004; Tay <i>et al.</i> , 2010.....	11
Tabla 5. Características de los huevos de nematodos.....	16
Tabla 6. Características de huevos de cestodos y trematodos.....	16
Tabla 7. Tiempo de supervivencia de diferentes patógenos en suelos y vegetación (Jimenez & Maya, 2007)17	
Tabla 8. Archivo fotográfico de los huevos de helminto seleccionados.....	25

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) establece que la meta número uno del reúso del agua residual en la agricultura es eliminar la pobreza y el hambre en los países en vías de desarrollo. Su reúso, además de permitir el ahorro de agua de primer uso, incrementa el rendimiento de los cultivos por el aporte de nutrientes y materia orgánica que ésta contiene, lo que beneficia y mejora las propiedades de los suelos, y disminuye la contaminación que su vertido a cuerpos de agua superficiales ocasiona (WHO, 2006).

En la actualidad el reúso del agua residual para la agricultura se ha incrementado considerablemente, el total de la tierra regada con agua residual sin o parcialmente tratada se estima en alrededor de 20 millones de hectáreas en 50 países, lo que representa aproximadamente un 10% del total de las tierras de riego, y que al menos el 10% de la población mundial consume alimentos producidos a base de riego con este tipo de agua (Smit & Nasr, 1992).

No obstante, las ventajas del reúso del agua residual, ésta puede representar riesgos a la salud tanto para los agricultores y sus familias, como para los consumidores del producto de la cosecha, si ésta es dispuesta sin el tratamiento adecuado. Lo anterior se debe a que contiene una alta diversidad de parásitos patógenos capaces de sobrevivir en el ambiente el tiempo suficiente para ser transmitidos e infectar a los humanos. Tal es el caso de los helmintos, conocidos vulgarmente como gusanos parásitos, cuyo riesgo se debe a la persistencia de sus estadios infecciosos en el agua contaminada, suelos o cultivos durante meses e incluso años (Jiménez *et al.*, 2016).

A este respecto, y dada su capacidad infecciosa, se calcula que existen cerca de 2.5 billones de personas infectadas alrededor del mundo (Jiménez *et al.*, 2016). La WHO (1989) con el objetivo de eliminar los riesgos inherentes a la salud que el reúso del agua residual en la agricultura conlleva, estableció los criterios y regulaciones para este tipo de patógenos, en su estadio de huevo, etapa infectiva del ciclo de vida, cuyo valor es ≤ 1 huevo/L en agua residual destinada al riego (WHO, 1989; WHO, 2006). Criterios adoptados, también, dentro de la Normatividad Mexicana, NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece que, para el reúso de agua residual en servicios al público con contacto directo, el límite máximo permisible será de ≤ 1 huevo/litro (riego no restringido) y en agua con contacto indirecto u ocasional con el público será de ≤ 5 huevos/litro (riego restringido).

Para evidenciar que tales criterios se cumplen, resulta necesario utilizar técnicas que permitan cuantificar el contenido de huevos de helmintos con un límite tal de detección; sin embargo, las metodologías y procedimientos actuales, no siempre son eficientes, sobre todo en su etapa final, donde, sin importar el tipo de técnica empleada, técnicos expertos son requeridos para la identificación y cuantificación de los diferentes géneros y especies que constituyen a este grupo amplio de parásitos. Problema aun mayor cuando las muestras analizadas presentan un alto contenido de partículas o detritus¹, requiriendo de tiempos amplios de observación directa al microscopio óptico, lo que en ocasiones trae como consecuencia un sobre o subconteo, y con ello resultados subjetivos y poco confiables.

¹ Detritus: resultado de la descomposición de una masa sólida en partículas, sedimento dentro del agua residual

Una alternativa real para la identificación y cuantificación automática de huevos de helmintos en muestras de agua residual de diferentes calidades, con base en su contenido de sólidos totales, a partir de imágenes de microscopía procesadas en laboratorios ambientales, eliminando la necesidad de un experto, la constituyen los avances en algoritmos y sistemas de procesamiento y reconocimiento digital de imágenes, los cuales se basan en sistemas: a) comparativos con bases de datos de imágenes y b) de entrenamiento durante su reconocimiento.

Debido a ello, el objetivo del presente trabajo de tesis fue desarrollar un sistema automático, como una propuesta alternativa precisa y rápida para la cuantificación e identificación de diferentes géneros y especies de huevos de helmintos de importancia médica, frecuentemente detectados a nivel mundial.

2. ANTECEDENTES

2.1 Parásitos en el agua residual

El agua residual, al ser producto de la mezcla de desechos de todo tipo, puede contener un sin número de agentes patógenos, tales como virus, bacterias, protozoarios y helmintos; los cuales, por falta de saneamiento y/o una inadecuada disposición pueden representar un riesgo a la salud de la población. A continuación se describen a estos cuatro grupos de organismos, los tres primeros se abordan de forma general, mientras que en el caso de los helmintos, y al ser éstos el principal tema de estudio, se describen con mayor detalle.

Virus

Existen más de 140 tipos de virus entéricos capaces de infectar el tracto intestinal y ser desalojados en las heces, un gramo puede contener hasta 10^9 partículas de virus infecciosos. Aunque no se pueden multiplicar fuera de una célula hospedera, pueden sobrevivir por semanas en matrices tales como agua residual (de 7 a 15 semanas). Existen 5 tipos de virus que son particularmente importantes por su impacto a la salud: adenovirus, enterovirus (incluyendo virus de la polio), virus de la hepatitis A, rotavirus y reovirus (Feachem *et al.*, 1983).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares, que se reproducen en condiciones ambientales favorables (temperatura, pH, etc.), muchas especies son inocuas al hombre. Dentro de éstas, existe un grupo denominado coliformes fecales (no patógenos), debido a que colonizan el intestino y son desalojados en las heces donde se encuentran en gran número (más de 10^{12} por gramo), razón por la que son comúnmente utilizadas como indicadores tradicionales de contaminación fecal en el agua, ya que su presencia indica la posible existencia y/o sobrevivencia de bacterias patógenas al hombre como el caso de *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* (Bitton, 1995).

Protozoarios

Los protozoos son organismos unicelulares, de los cuales se han descrito alrededor de 50,000 especies, entre éstas solo una veintena patógenas para el hombre. Una vez que éstas infectan al ser humano, se albergan en el tracto intestinal y pueden causar diarrea o disentería². Una característica común de este grupo es la formación de quistes o estructuras de resistencia cuando las condiciones ambientales son desfavorables (tales como pH, temperatura, alimento, etc.), para posteriormente retornar a su estadio de trofozoíto³, cuando las condiciones les son favorables (Pumarola *et al.*, 1992). Dentro de los protozoarios patógenos intestinales de mayor importancia se encuentran las especies *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Balantidium coli* y *Entamoeba histolytica* (Feachem *et al.*, 1983).

² Disentería: Trastorno inflamatorio del intestino, que causa dolor abdominal y diarrea con sangre, entre otros síntomas.

³ Trofozoíto: Estado adulto del ciclo de vida de un protozoo.

2.2 Helmintos

2.2.1 Generalidades

Término designado a un amplio grupo de organismos que incluye a todos los gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales) y de vida libre, con forma y tamaños variados. Poseen órganos diferenciados, pueden tener aparato digestivo o no, su sistema reproductor está altamente desarrollado y sus ciclos de vida comprenden la producción de huevos y/o larvas, infecciosas o no y la alternancia compleja de generaciones que incluye hasta tres huéspedes diferentes. Muchos de ellos cuentan con órganos especializados en succionar o atacar al huésped (Pumarola *et al.*, 1992). Los helmintos son metazoarios (organismos pluricelulares) complejos en sus funciones digestivas, de respiración y de excreción. Algunos son hermafroditas y otros dioicos (sexos separados), ovíparos y unos pocos vivíparos. La mayoría tiene cutícula, órganos de fijación, carecen de sistema circulatorio, aparato respiratorio y son móviles (Romero, 2007). Los helmintos en su edad adulta tienen diferentes tamaños que van desde 1 mm hasta varios metros, poseen diferentes ciclos de vida y se desarrollan en condiciones ambientales diversas (Jimenez & Maya, 2007).

2.2.2 Clasificación

Los helmintos se clasifican en tres diferentes Phyla: Nematelmintos (Aschaelmintos) o gusanos redondos no segmentados, Platelmintos o gusanos planos y Annelidos o gusanos redondos segmentados. Los dos primeros grupos infectan al humano a través del agua o alimentos contaminados, el tercer grupo se refiere a los gusanos de vida libre, por lo que no son de interés dentro del presente trabajo de tesis. A continuación se describen sólo los de importancia médica.

Nematelmintos

Los nematodos abarcan cerca de 25,000 especies (Brusca & Brusca, 2003). Son gusanos invertebrados, cuerpo cilíndrico sin segmentos y simetría bilateral. Su cuerpo es delgado, con el extremo anterior y posterior terminados en punta (Saredi, 2002). Los nematodos son organismos más evolucionados que los platelmintos, tienen aparato digestivo completo y poseen una cutícula que los aísla del medio ambiente, son dioicos, es decir, tienen sexos separados. Su tamaño varía de unos cuantos mm (especies fitoparásitas), hasta varios cm (parásitos vertebrados). Los ciclos de vida de la mayoría de los nematodos presentan varios huéspedes intermediarios, siendo el hombre casi siempre el definitivo (Gallego, 2007).

Platelmintos

Los platelmintos o gusanos planos, tienen en su cuerpo un diámetro menor en relación con otro mayor, dándoles un aspecto aplanado, son metazoarios, pero poco evolucionados, no poseen cutícula, por lo que no tienen una cubierta que aísla el interior del organismo de su exterior (Romero, 2007).

Dentro de los platelmintos, existen 2 grandes grupos, los Cestodos y los Trematodos. En el primero (gusanos segmentados) se localizan los parásitos denominados Tenias o solitarias, de interés médico, carecen de sistema digestivo y requieren al menos de 2 huéspedes en su ciclo de vida. En

el caso de los Trematodos (gusanos no segmenados), son parásitos más evolucionados que los Cestodos, tienen un aparato digestivo rudimentario y son hermafroditas, éstos pueden tener de uno a dos hospederos durante su vida (Romero, 2007).

Cestodos

Las 3,400 especies descritas son endoparásitos, poseen un cuerpo aplanado dorso-ventralmente con ventosas y ganchos para absorber nutrientes. Los cestodos adultos a menudo son de un color blancuzco, están formados por tres estructuras y se alimentan por ósmosis de los nutrientes del huésped. Las estructuras comunes en los cestodos son el escólex, el cual cumple la función de ser el mecanismo de fijación del parásito a la mucosa intestinal del huésped; el estróbilo, el cual sirve para la fertilización (lugar donde se almacenan los huevos), y un cuello que es la unión entre las dos estructuras antes mencionadas (Fernández & Rivas, 2007). En su forma adulta, los géneros de cestodos que con mayor frecuencia parasitan el intestino del hombre son *Hymenolepis nana*, *Taenia saginata* y *Taenia solium* (Biagi, 2004).

Trematodos

Tienen forma de hoja, la mayoría son hermafroditas y están provistos de tubo digestivo ramificado, presentan ciclos de vida complejos, que incluyen habitualmente uno o dos hospederos intermediarios y el hombre como el hospedero final. Diversas especies de trematodos son parásitas del hombre, en México, la más importante es *Fasciola hepática* (Biagi, 2004).

En la Figura 1 se muestra esquemáticamente la clasificación de los helmintos de importancia médica.

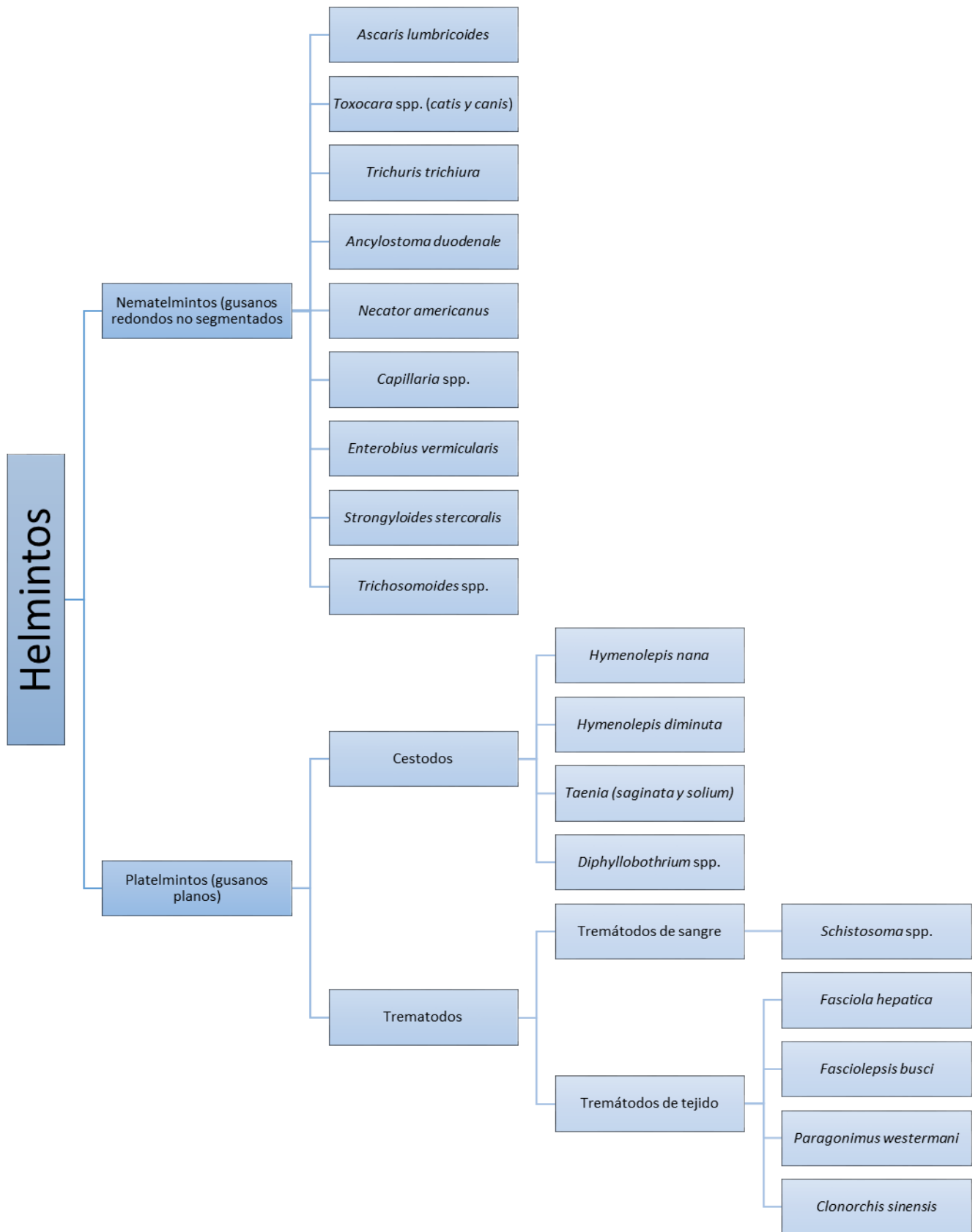


Figura 1. Clasificación de los helmintos de interés médico (Jiménez & Maya, 2007).

2.2.3 Mecanismos de transmisión

La helmintiasis, término que se utiliza para referirse a un grupo de enfermedades parasitarias ocasionadas por helmintos, comienza cuando los huevos, que producen los gusanos adultos que viven dentro del intestino de las personas infectadas, son desalojados en la heces fecales y de ahí transportados al agua residual, donde la transmisión puede ocurrir a través de varias formas: a) por cultivos contaminados que no son lavados y/o cocinados adecuadamente, b) por la ingestión de agua contaminada, c) por el contacto con suelos contaminados, siendo con frecuencia los más afectados niños menores de 5 años y d) a través de la infección directa de la larva, cuando ésta penetra a través de una herida de la piel, por caminar descalzo en agua o suelo contaminados, tal como ocurre en el caso del grupo de las Uncinarias⁴ (WHO, 2016).

2.2.4 Distribución mundial

Como se mencionó previamente, más de 2.5 billones de personas a nivel mundial han sido o son hospederos de alguna de las especies de helmintos. La mayor parte de estas infecciones ocurren en Asia, donde al menos un cuarto de la población son hospederos (26.4%). Este tipo de patógenos también se encuentran distribuidos ampliamente en zonas tropicales y subtropicales, con mayor presencia en la zona del Sahara en África y Sudamérica. Dentro de los helmintos, la infección ocasionada por la especie *Ascaris lumbricoides* es una de las ocho enfermedades que afectan a más del 10% de la población mundial y la de mayor distribución mundial (Pullan *et al.*, 2014).

La prevalencia de algunas de las especies de helmintos de importancia médica a nivel mundial y una estimación de la población mundial infectada por diferentes especies de helmintos por región, se pueden observar en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

⁴ Uncinarias: Grupo formado por dos géneros de nematodos: *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*

Tabla 1. Especies de helmintos y helmintiasis reportadas en diferentes regiones del mundo (Jiménez et al., 2016)

Helminto	Prevalencia (millones de habitantes)	Presencia regional
Clase Nematoda		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	819	Diversas regiones del sureste de Asia, África y Centro y Sudamérica.
<i>Trichuris trichiura</i>	465	Regiones húmedas, templadas y tropicales en Asia, África Sudamérica y América central y las islas del Caribe.
<i>Ancylostoma duodenale</i> y <i>Necator americanus</i> (Uncinaria)	439	Países tropicales, subtropicales y países en la Zona del Sahara en África
<i>Strongyloides stercoralis</i>	370	Comunidades rurales en Asia
<i>Trichostrongylus orientalis</i>	Indefinido	
Clase Cestoda		
<i>Hymenolepis nana</i>	50	Más comúnmente en áreas con higiene deficiente como Sudamérica, el Sureste de Asia, el este y oeste de África, también se puede encontrar en áreas tropicales y subtropicales del sur y este de Europa así como en Estados Unidos.
<i>Taenia solium</i>	50	
Clase Trematoda		
<i>Schistosoma mansoni</i>	207	Regiones tropicales y subtropicales
<i>Clonorchis sinensis</i>	56	Con gran presencia en el Sur y este de Asia, pero también en el Centro y este de Europa.
Otros grupos	100	Distribución mundial
Total	Más de 2.5 billones de afectados mundialmente	

Tabla 2 Estimación de la población infectada por región. Fuente: Pullan et al., 2014

Región	Población (millones)	Población infectada (millones)					
		Porcentaje de la población infectada por país					
		<i>A. lumbricoides</i>		<i>T. trichiura</i>		Uncinarias	
Asia	3,736.7	589		282.3		281.8	
		Malasia	41.7%	Malasia	49.9%	Nepal	30.7%
		Bangladesh	38.4%	Filipinas	45.5%	Bangladesh	22.3%
		Filipinas	33.6%			Malasia	21.0%
Centro y Sur de África	866	117.9		100.8		117.7	
		Camerún	30.8%	Guinea Ecuatorial	38.8%	República Centroafricana	30.5%
		Congo	38.8%	República Centroafricana	11.8%	Eritrea	2.3%
América Latina y el Caribe	586	86		72.2		30.3	
		Ecuador	35.8%	Venezuela	28.4%		
		Venezuela	28.4%	El Salvador	5.1%		
Norte de África y Medio Oriente	477	24.3		8.7		4.6	
		Jordania	19.2%				
		Moroco	8.0%				
Oceanía	9.6	1.9		0.6		4.6	
						Papua Nueva Guinea	60.6%
Global	5631.4	819		465		439	

Los diversos estudios hasta ahora realizados indican que la distribución de estos patógenos obedece en cierta parte a las características socio-económicas del país en que se analice; por ejemplo, el contenido de huevos de helmintos en agua en países en vías de desarrollo varían entre 70 y 300 HE/L (Feachem *et al.*, 1983; Strauss *et al.*, 2003; Jiménez & Wang, 2006; Trönnberg *et al.*, 2010, WHO, 2006), mientras que para los países desarrollados el contenido es menor, con concentraciones en agua de 1 HE/L (Jiménez & Wang, 2006), lo que confirma tal aseveración.

Para el caso de México, en la Tabla 3 **Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** se observa el porcentaje de habitantes parasitados por algunas especies de helmintos para el año 2002.

Tabla 3 Frecuencia estimada de algunas parasitosis por helmintos intestinales en la República Mexicana en el año 2002
Fuente: Biagi, 2004.

Helminto	Número de infectados	% de habitantes parasitados
<i>Ascaris lumbricoides</i>	16,600,000	33.3
<i>Trichuris trichiura</i>	14,200,000	28.4
Uncinarias	5,220,000	26.2
<i>Hymenolepis nana</i>	3,800,000	7.6
Total	39,820,000	80

2.2.5 Helmintos de importancia médica

Los síntomas más comunes de las la helmintiasis son: dolor abdominal, diarrea, desnutrición, y anemia (Biagi, 2004; Tay *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2016). La alteración del estado nutricional de las personas infectadas es lo más recurrente, dado que los gusanos se alimentan de los tejidos del hospedero (incluyendo sangre), lo que ocasiona una pérdida de hierro y proteínas, aunado a que compiten por la vitamina A en el intestino, todo ello conduce a un decadente crecimiento físico y desarrollo cognitivo, lo que produce un bajo rendimiento académico y absentismo en niños, reduce la productividad en el trabajo en adultos y tiene consecuencias adversas en el embarazo (WHO, 2012; Jiménez *et al.*, 2016).

En la Tabla 4 se describen con mayor detalle los síntomas, características específicas de las patologías causadas por algunos géneros de helmintos de mayor importancia y su prevalencia en México.

Tabla 4 Síntomas y prevalencia de enfermedades causadas por helmintos Fuente: Biagi, 2004; Tay et al., 2010

Helminto	Helmintiasis	Síntomas	Prevalencia
Nematodos			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	Cuadros neumónicos con insuficiencia respiratoria, tos, dolor abdominal, náuseas, vómito, anorexia, palidez, pérdida de peso. En casos graves, se desarrollan complicaciones que ponen en peligro la vida de los pacientes.	Es una de las parasitosis más comunes, en promedio una tercera parte de los mexicanos la tiene y es mucho más frecuente en niños.
<i>Trichuris trichiura</i>	Tricocefaliasis	Dolor abdominal, evacuaciones con sangre, diarrea, disentería, anemia, palidez, cefalea ⁵ , pérdida abrupta de peso, en casos más graves cuadros dolorosos en la fosa ilíaca derecha, apendicitis e incluso la muerte.	Esta enfermedad es mucho más frecuente en regiones tropicales, como ejemplo en México se encuentra en un 81% de prevalencia en Escárcega, Campeche, de clima húmedo tropical.
Uncinarias	Uncinariasis	Sintomatología pulmonar como tos, diarrea, dolores abdominales, náuseas, vómito, anemia, pérdida de apetito y sangrado crónico intestinal.	En México en poblados ubicados en zonas tropicales afecta hasta 66% de lactantes, 86% de preescolares y 94% de escolares, en lactantes se ha visto varios casos importados a la Ciudad de México.
Cestodos			
<i>Hymenolepis nana</i>	Hymenolepiasis	Palidez, dolor abdominal, anorexia, meteorismo, diarrea y cefalea.	Prevalece con mayor frecuencia en niños y puede encontrarse hasta en 27% de éstos. Es la helmintiasis intestinal más común en las zonas templadas de México.
<i>Taenia solium</i> o <i>Taenia saginata</i>	Taeniasis	Dolor abdominal, diarrea y cefalea.	En México este padecimiento se localiza en todo el país aunque no es muy frecuente.
Trematodos			
<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomiasis	Dermatitis de los nadadores, fiebre, cefalea, tos, infiltrado pulmonar y urticaria, en fases más avanzadas se presenta insuficiencia hepática e hipertensión, así como complicaciones pulmonares, puede llegar hasta la muerte.	La schistosomiasis es una de las parasitosis de mayor trascendencia clínica y socioeconómica, en especial en África por su elevada frecuencia, así como por su impacto en la salud y en la productividad de las personas.
<i>Fasciola hepatica</i>	Fascioliasis	En la etapa inicial se presenta fiebre, malestar general y dolor en el área hepática; mientras en infecciones graves se presenta notable pérdida de peso, tos y signos de infiltración en la base del pulmón derecho.	Está presente en toda la República Mexicana, sólo el norte de la península de Yucatán se encuentra libre de ella.

⁵ Cefalea: Dolor de cabeza intenso.

2.2.6 Ciclos de Vida

Los helmintos tienen diferentes y complejos ciclos de vida, así como ambientes ideales para su desarrollo. Cuando el hombre es su hospedero final, con frecuencia migran a través del cuerpo hasta alcanzar el órgano definitivo, donde pueden sobrevivir durante todo su ciclo de vida (Caballero, 1998). A continuación se describen algunos ejemplos de ellos.

2.2.6.1 Nematodos

Los ciclos de vida de los diferentes géneros de nematodos son variados y complejos, pueden incluir la combinación de dos o más huéspedes intermediarios, y pueden ser directos o indirectos. Los nematodos se localizan en prácticamente todos los órganos y tejidos del hombre, algunos de los que habitan el tubo digestivo tienen un ciclo directo como el caso de *Enterobius vermicularis*, ya que una vez que los huevos embrionados son ingeridos, la larva eclosiona y madura en el intestino; otros, como el caso de *Ascaris lumbricoides*, después de que la larva eclosiona en el intestino, efectúa una migración a través de diferentes órganos del huésped, para finalmente regresar al tubo digestivo y alcanzar la etapa adulta; en otros casos como el caso de *Ancylostoma duodenale* los huevos requieren permanecer cierto tiempo (de 24 a 48 horas) en suelos adecuados (cálidos y húmedos), donde la larva eclosiona y muda hasta dar lugar a una larva filiforme⁶ infectante, que una vez que penetra por la piel, migra al tubo digestivo. Algunos más, como el caso de *Trichinella spiralis* presentan un ciclo evolutivo indirecto, en él intervienen huéspedes intermediarios que generalmente son invertebrados, moluscos, crustáceos o insectos como en las filarias⁷, cuyas microfiliarias⁸ siguen su desarrollo a la siguiente etapa evolutiva, sólo después de ser ingeridas por un insecto hematófago (mosquito), migran por los tejidos y se desarrollan en su etapa infectante para ser inoculadas en la piel del hombre a través de la probóscide⁹ del insecto transmisor, cuando éste se alimenta de sangre. Las larvas alcanzan su madurez después de semanas o meses (Tay *et al.*, 2010). Dada su importancia, y como ejemplo de la complejidad que llegan a alcanzar los ciclos, a continuación se describe con mayor detalle el ciclo de vida del nematodo *Ascaris lumbricoides*.

Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*

Uno de los ciclos de vida de nematodos más estudiado es el de la especie *Ascaris lumbricoides*. Los huevos al ser excretados junto con las heces son transportados en el agua residual, la cual al ser dispuesta para riego permite la dispersión de los huevos hacia el suelo, donde requieren un período de maduración de alrededor de 10 días para que una larva de segundo estadio¹⁰ se desarrolle y adquiera su capacidad infectante. Una vez que los huevos son ingeridos y llegan a la porción alta del intestino delgado, las larvas denominadas rhabditoides o rhabditiformes, cuyos tamaños oscilan entre 200-300 μm de largo por 14 μm de ancho, eclosionan del huevo y penetran la mucosa intestinal para pasar al torrente sanguíneo hasta el hígado (donde permanecen de 3 a 4 días). Posteriormente,

⁶ Filiforme: En forma de hilo (alargada)

⁷ Filaria: Parásito del orden de los nematodos que por su forma y longitud asemeja un hilo.

⁸ Microfiliarias: Forma larval del parásito filaria

⁹ Probóscide: Aparato bucal dispuesto para succionar que tienen algunos insectos

¹⁰ Larva de segundo estadio: Etapa del ciclo de vida del *Ascaris lumbricoides* donde la larva adquiere su capacidad infectante.

pasan por las cavidades derechas del corazón y de ahí a los pulmones (donde permanecen entre 8 y 10 días), rompen capilares, invaden los alvéolos, bronquios y tráquea. Suben hasta la epiglotis para ser deglutidas y pasar nuevamente al intestino, donde continúan creciendo hasta convertirse en adultos, aproximadamente después de ocho a doce semanas de la infección (Saredi, 2002). Es en el intestino, y una vez que las hembras adultas son fecundadas por los machos, donde los huevos se depositan y son excretados en las heces y el ciclo se reinicia (Figura 2).

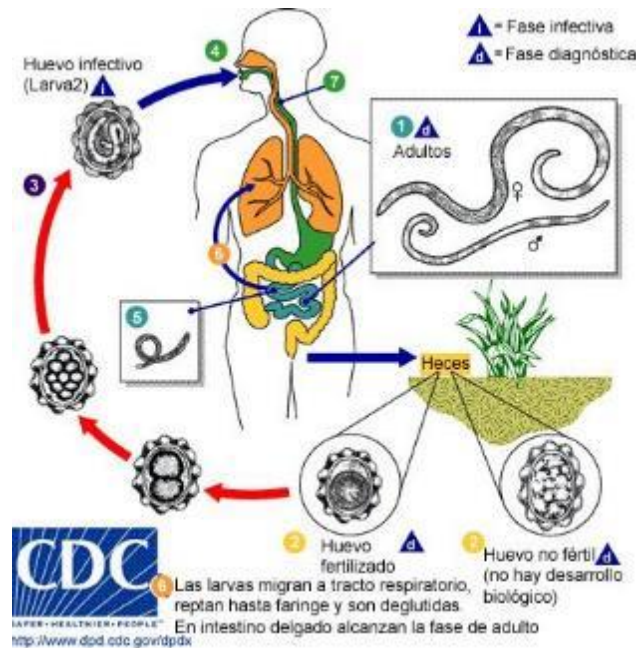


Figura 2. Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*. Fuente: Uribarren, 2016

2.2.6.2 Cestodos

Los cestodos presentan variaciones en los tipos de ciclos biológicos que utilizan para perpetuar a su especie, pueden tener: a) un huésped definitivo, b) un huésped definitivo y un huésped intermediario, y c) hasta un huésped definitivo y dos huéspedes intermediarios (Tay *et al.*, 2010).

Como ejemplo de un huésped definitivo y un huésped intermediario está el caso de la especie de *Taenia solium*, en general su ciclo de vida comienza con la ingestión de huevos de cestodo por el hospedero intermediario en cuestión (por lo general cerdos). Una vez que el huevo llega al estómago, su cubierta exterior se reblandece y eclosiona en el intestino delgado liberando la oncosfera (embrión o exocanto activado), la cual se introduce en las vellosidades intestinales por la acción combinada de sus ganchos que desgarran el tejido y de secreciones líticas que digieren la mucosa. Posteriormente, alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que la llevan a diferentes órganos (hígado, pulmones y músculos), en donde se desarrolla y se transforma en cisticercoide, una vesícula translúcida, ovoide o circular de 5 a 10 μm de diámetro con un pequeño gusano o escólex metido hacia dentro (invaginado) y que puede permanecer en los tejidos del hospedero intermediario durante varios años, rodeado por una cápsula de tejido conectivo, normalmente esta larva queda atrapada en la masa muscular del cerdo. El ciclo de vida continúa cuando el ser humano

(hospedero definitivo) consume la carne de cerdo infectada con uno o varios cisticercos viables. La masticación, las sales biliares y las proteasas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la salida o evaginación del escólex. Una vez fuera del huevo, el escólex se fija en la pared del yeyuno y comienza a crecer y diferenciarse hasta convertirse, en aproximadamente cuatro meses, en una lombriz adulta llamado "solitaria" (Lamothe & García, 1988; Pumarola *et al.*, 1992; Tay & Trinidad, 2002).

El ser humano puede, también, actuar como huésped intermediario accidental, al ingerir alimentos, frutas o agua contaminada con huevos provenientes de un individuo con taeniasis; o puede auto-infestarse mediante la vía ano-mano-boca (holofagia); o, más frecuentemente, la infestación se produce a partir de huevos eclosionados dentro del propio hospedador. En la Figura 3 se muestra el ciclo general correspondiente al cestodo *Taenia* spp.

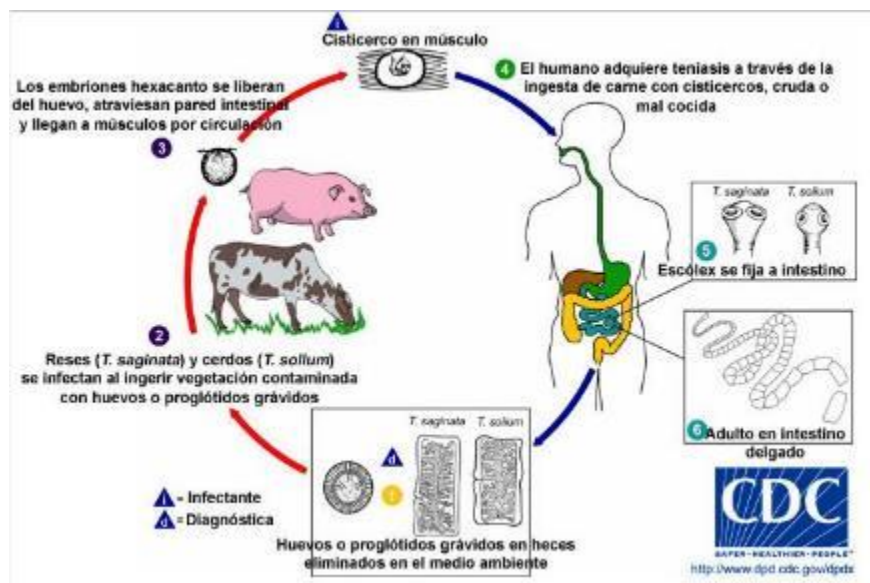


Figura 3. Ciclo de vida del género *Taenia* spp. Fuente: Uribarren, 2016

2.2.6.3 Trematodos

En el caso de los trematodos normalmente denominados como lombrices de sangre, la especie *Schistosoma mansoni* durante su ciclo de vida y una vez que los huevos maduros son descargados juntos con la heces, eclosionan en respuesta a condiciones ambientales favorables (tales como la temperatura y luz), liberan larvas ciliadas llamadas miracidios, las cuales se introducen en caracoles de agua o moluscos que sirven como hospederos intermediarios. En alrededor de 4 semanas, los miracidios mudan a la etapa de larva cercaria¹¹, las cuales migran nuevamente a los cuerpos de agua, donde mediante la penetración de la piel o por el consumo de la carne de pescado contaminada (posible hospedero intermediario) infectan a los humanos. Dentro de éstos, las cercarias una vez

¹¹ Cercaria: Forma larval del parásito liberado del primer hospedero intermediario que es el caracol o molusco

que alcanzan su madurez sexual, migran a los pulmones (de 3 a 4 días), posteriormente al torrente sanguíneo, hígado y plexo vesical donde se reproducen. Después de 35 días los huevos maduros son excretados en las heces u orina para comenzar el ciclo una vez más (Figura 4).

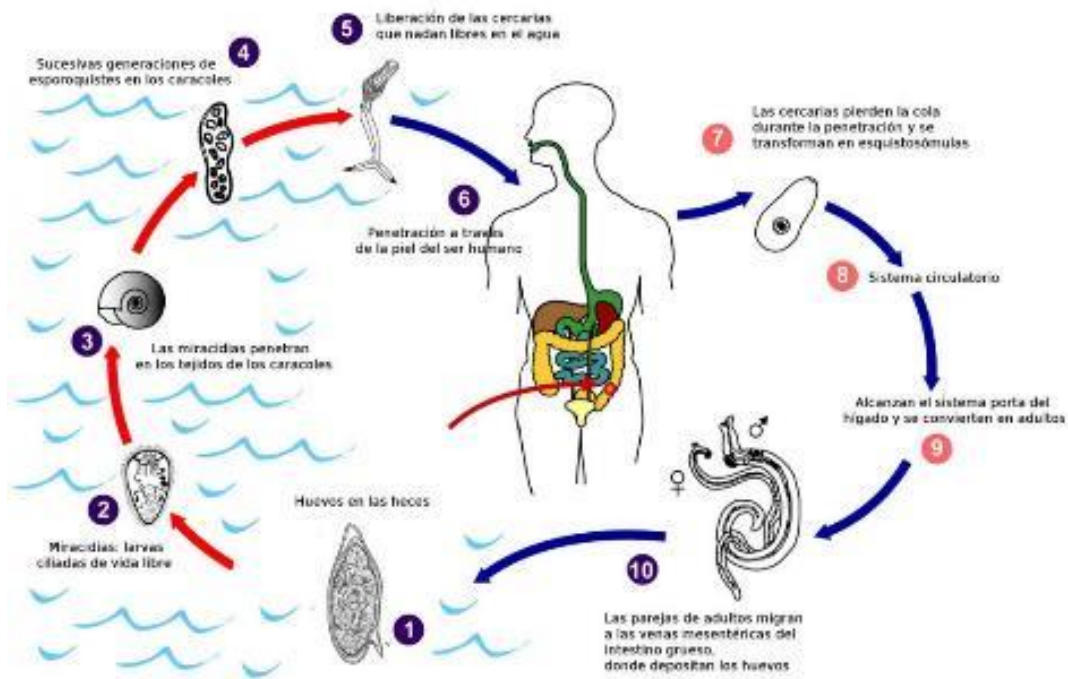


Figura 4. Ciclo de vida *Schistosoma mansoni*. Fuente: García, 2012

2.2.7 Huevos de Helmintos

Una característica común de todos los helmintos es que su reproducción es a través de huevos. Poseen una capacidad de ovoposición alta (huevos/día). Por ejemplo, durante los 10 a 24 meses que tienen de vida, los géneros de *Ascaris* y *Toxocara* generan 200 000, *Trichuris* 5 000 a 7 000, *Hymenolepis* 100 000 y *Taenia* 700 000 huevos (Ellis *et al.*, 1993). Las Uncinarias *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* 10 000 y 50 000 huevos, respetivamente (Feachem *et al.*, 1983). Los huevos de helmintos son altamente infecciosos, se requiere una dosis de un huevo para ocasionar una infección (WHO, 2012; Pullan *et al.*, 2014; Strunz *et al.*, 2014).

Los huevos tienen formas y tamaños diferentes dependiendo del género y de la especie que se trate. Miden entre 20 y 80 μm , algunos como en el caso del *Schistosoma mansoni* pueden ser llegar a longitudes de 185 μm (Jiménez *et al.*, 2001). Presentan una densidad relativa que va de 1.06 a 1.24 y son de consistencia viscosa (Ayres *et al.*, 1992).

Las características más comunes de huevos de nematodos, cestodos y trematodos se observan en la Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente.

Tabla 5. Características de los huevos de nematodos

Género y especie	Tamaño	Características principales
<i>Ascaris lumbricoides</i>	40 a 80 μm de largo y 35 a 50 μm de ancho	Son esféricos de color café o café amarillento, la membrana externa presenta ondulaciones que reciben el nombre de mamelones.
<i>Toxocara canis</i>	75 a 95 μm de diámetro	Son esféricos, presentan una cubierta gruesa y finalmente granulada.
<i>Trichuris Trichiura</i>	50 a 60 μm de largo y 21 a 26 μm de ancho	Presentan forma de bolillo o barril y color marrón amarillento, con una gruesa envoltura de doble contorno y los polos están contruidos por tapones translucidos e incoloros.

Tabla 6. Características de huevos de cestodos y trematodos

Género y especie	Tamaño	Características principales
Cestodos		
<i>Hymenolepis diminuta</i>	80 μm de diámetro	Son esféricos, posee una capa protectora sin protuberancias.
<i>Hymenolepis nana</i>	30 a 50 μm de diámetro	Son ovoides, limitados por una envoltura externa que contiene al embrión denominado hexacanto y rodeado de un embrióforo con dos salientes polares en los que se observan de cuatro a ocho filamentos.
<i>Taenia solium</i>	30 μm de diámetro	Son esféricos, de paredes gruesas y radiadas. Poseen una capa protectora denominada embrióforo, dentro del cual se encuentra una oncosfera, embrión o hexacanto.
Trematodos		
<i>Schistosoma mansoni</i>	115 a 175 μm de largo y 45 a 70 μm de ancho	Son ovoides, de color amarillento, con la característica de una espina o espolón lateral, con polos redondeados.
<i>Fasciola hepatica</i>	130 a 150 μm de largo y 60 a 90 μm de ancho	Son ovoides y presentan un opérculo o tapón en el polo superior.

Los huevos de helmintos son considerados las partículas biológicas más resistentes en el campo de la Ingeniería Sanitaria (Jimenez & Maya, 2007). Esta resistencia es atribuida a la cubierta resistente que poseen, conformada por al menos tres capas, excretadas por el mismo huevo: la interna o proteínica, la media o quitinosa y la externa o lipoidal. Estas capas tienen la función de ser barreras selectivas, impiden el paso de materiales, y proveen de resistencia al huevo ante productos químicos que son letales a otros microorganismos, tales como ácidos fuertes y bases, oxidantes, agentes reductores, detergentes, compuestos proteolíticos y sales (Jimenez & Maya, 2007).

La importancia de los huevos dentro de la Ingeniería Ambiental, es que, a pesar de que son patógenos, se emplean en la evaluación de la eficiencia de procesos de tratamiento de agua residual, y son sus propios indicadores en normas ya que no hay ningún otro indicador biológico que se comporte como éstos.

De acuerdo con Jimenez & Maya (2007), los huevos de helmintos pueden vivir en agua, suelo o cultivos por meses, incluso hasta años, teniendo un tiempo de supervivencia mayor al reportado para otros microorganismos (Tabla 7).

Tabla 7. Tiempo de supervivencia de diferentes patógenos en suelos y vegetación (Jimenez & Maya, 2007)

Organismo	Suelo		Vegetación	
	Máximo absoluto	Máximo común	Máximo absoluto	Máximo común
Virus	100 días	20 días	2 meses	15 días
Bacteria	70 días	20 días	30 días	15 días
<i>Giardia lamblia</i> (Protozoario)	20 días	10 días	10 días	2 días
Huevos de Helmintos	Meses	Meses	2 meses	1 mes

A diferencia de los virus, bacterias (incluidos los coliformes fecales) y protozoarios patógenos, los huevos de helmintos no pueden ser inactivados con los procesos convencionales de desinfección, como el cloro, luz ultravioleta u ozono, no al menos con dosis óptimas requeridas para los otros grupos de organismos, sino que requieren de dosis mayores; por ejemplo, 10,000 mg/L de cloro o de 36 mg O₃/L con un tiempo de contacto de 1 hora (Rojas *et al.*, 2003), lo cual representaría un costo económico elevado para un tratamiento convencional. Los huevos de helmintos se caracterizan por:

- Persistencia en diversos estadios en el ambiente
- Una dosis infectiva mínima (1/L)
- Ningún tipo de inmunidad en los humanos
- Período de latencia largo
- Resistencia a diversos procesos de desinfección, cloro, luz ultravioleta y al ozono.

2.3 Normatividad para el reúso de agua residual en la agricultura (Criterios internacionales: WHO; Criterios Nacionales: NOM-003-SEMARNAT-1997)

Basado en estudios epidemiológicos, la WHO (1989), con el propósito de proteger la salud pública y fomentar un uso racional del agua residual en la agricultura, estableció criterios y recomendaciones para dicha práctica, estableciendo el límite de ≤1 huevo de helminto por litro. Mismo que ratificó en 2006 y 2016, mismos que han sido adoptados a nivel internacional.

La Normativa Mexicana no es la excepción, la NOM-003-SEMARNAT-1996, correspondiente al uso del agua residual en suelos agrícolas que establece los límites máximos permisibles de contaminantes, indica que para el caso de los huevos de helmintos:

- para el reúso de agua residual en servicios al público con contacto directo (cultivos que son consumidos crudos, riego no restringido) ≤ 1 huevo/litro
- para el reúso de agua residual en servicios al público con contacto indirecto u ocasional (cultivos normalmente cocidos antes de consumirse, riesgo restringido) ≤ 5 huevo/litro.

2.4 Importancia de la evaluación de la calidad del agua residual para reúso agrícola

De esta forma, el mayor riesgo a la salud asociado al reúso del agua residual sin un tipo de tratamiento adecuado, son los huevos de helmintos. Debido a que sus diversos estadios infecciosos (huevos y/ o larvas) son altamente persistentes en el ambiente, y a su dosis mínima infectiva; es a través del agua que ocurre su diseminación directa o indirecta, llegando a ocasionar infecciones en la población. Dado el potencial de infección de este tipo de parásitos, la evaluación de su contenido en el agua es de primordial importancia, en particular un límite de < 1 HH/L, para así tener la seguridad de que se cumple con la normatividad y se eliminan los posibles riesgos de infección.

2.5 Técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos

Buena parte de las técnicas para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos se conforman de dos etapas, la primera comprende una separación, limpieza y concentración de los huevos del resto del detritus; mientras que en la segunda etapa, los huevos son identificados y cuantificados por personal experto, a través de la observación directa al microscopio óptico. Basado en las técnicas empleadas en la primera etapa para determinar y cuantificar los huevos de helmintos, existen dos tipos: los métodos físicos y métodos indirectos.

2.5.1 Métodos físicos

Son los métodos empleados para la separación por medio de la diferencia de densidad entre los parásitos y el detritus a través del uso de reactivos de densidad específica. Normalmente estas técnicas son utilizadas para la determinación y cuantificación de huevos para volúmenes de muestra que van de 1 a 5 litros. La separación se puede ejecutar por sedimentación o por flotación (Gaspar *et al.*, 1994):

- Sedimentación: cuando el reactivo de dilución es menos denso que los parásitos, éstos se depositan, ya sea por la acción de la centrifugación o en forma espontánea.
- Flotación: cuando la solución presenta una densidad igual o mayor que la de los parásitos. Se utiliza para limpiar las muestras de basura e incrementar la eficiencia en la detección. Se pueden utilizar reactivos tales como nitrato de sodio (NaNO_3), sulfato de zinc (ZnSO_4) o sacarosa.

2.5.2 Métodos indirectos

La separación en estos métodos se logra por medio de la filtración de grandes volúmenes de agua con equipo especializado, lo que incrementa su costo. Algunos de estos métodos son:

- Filtros de lana o cartuchos de estambre: tiene un poro nominal de 1 μm . Se adapta al sistema Micro-Wynd y pueden filtrar volúmenes de 30 a 100 L (APHA, AWWA, WPCF, 1995).
- Filtros de membrana de acetato de celulosa: tiene de 8 a 10 μm de poro y 25 mm de diámetro. Requieren un procedimiento de deshidratación de la membrana con alcohol y la transparentación con glicerol.
- Filtros de arena de mar: tienen poros de 13 a 15 μm de diámetro. Los huevos quedan retenidos en la arena y son separados por medio de lavados sucesivos (APHA, AWWA, WPCF, 1995).

Existen técnicas utilizadas alrededor del mundo para la identificación y cuantificación de helmintos, las cuales combinan los diferentes procesos indicados anteriormente, las más comunes se describen a continuación:

- Técnica de U.S. EPA: Esta técnica requiere de 5 litros de muestra, y combina flotación, método bifásico y sedimentación para separar los huevos. La lectura de la muestra se efectúa a la totalidad de la pastilla o sedimento recuperado.
- Técnica de filtración con membrana: Utiliza 1 litro de muestra, combina flotación y un método indirecto para la concentración de los huevos. La cuantificación de los huevos se realiza a la totalidad de pastilla recuperada.
- Técnica Leeds I: Está basada en sucesivas centrifugaciones, seguidas de flotaciones. El volumen de la muestra analizada es de 1 litro si se analiza agua residual con alto contenido de sólidos y hasta 40 L si se analiza una muestra de agua residual con bajo contenido de sólidos. La lectura del sedimento final al microscopio es de la sección flotante final, la cual se lleva a cabo con una solución saturada.
- Técnica Faus: involucra varios ciclos de flotación, centrifugación y sedimentación, analizando un volumen de muestra similar al de la técnica Leeds I, de 1 a 40 litros. La identificación y cuantificación de los huevos es realizada de una alícuota de la pastilla final de la última sedimentación.

2.6 NMX-AA-113-SEMARNAT-1999 (NMX técnica tradicional para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos en agua)

Norma mexicana que establece el método de prueba para la detección y cuantificación de huevos de helmintos en aguas residuales, con el fin de evaluar la eficiencia de los sistemas de tratamiento y la calidad del agua producida. Este método de análisis se basa en la diferencia de densidades entre los huevos de helmintos y las demás partículas presentes en las aguas residuales. El método comprende los procesos de sedimentación, centrifugación, flotación, decantación, y el bifásico para recuperar los huevos. El conteo se realiza a través de la observación directa al microscopio óptico (Anexo 1).

2.7 Debilidades de la técnica tradicional. Segunda etapa de las técnicas: identificación y cuantificación a través de la observación directa al microscopio

Como se indicó de forma previa, la mayoría de los métodos para la separación y concentración de los huevos de helmintos comprenden una segunda etapa o fase final donde los huevos son identificados y cuantificados, con la ayuda de un microscopio óptico, por un técnico altamente capacitado con conocimientos en biología y parasitología.

Esta etapa del proceso es crítica ya que constituye la principal fuente de errores e incertidumbres de la metodología, se complica aún más cuando la muestra contiene un alto contenido de detritus o sólidos, ya que la discriminación de los huevos se vuelve tediosa y en ocasiones requiere de tiempos excesivos de observación directa al microscopio óptico. La identificación y cuantificación toma cerca de 30 minutos en muestras relativamente limpias (agua residual tratada), pero la situación empeora cuando las muestras a observar corresponden a un agua residual parcialmente tratada o cruda, requiriendo tiempos de hasta 2 horas o más por muestra.

2.8 Experiencias en la aplicación de procesamiento de imágenes para la detección de estructuras biológicas.

Con la finalidad de solventar las limitaciones que las técnicas tradicionales conllevan en su etapa final de identificación y cuantificación de huevos de helmintos sin la necesidad de contar con un técnico experto, de forma rápida y precisa, se consultaron los avances y experiencias en los algoritmos de procesamiento de imágenes relativos al campo del área ambiental y su posible aplicación en la identificación de este tipo de parásitos.

Fue posible evidenciar que los primeros sistemas digitales de procesamiento de imágenes para la identificación de organismos, realizados por Ciesielski & Spicer (1994), permitieron caracterizar el crecimiento bacteriano a través de fotografías, seguidos por Kreitz *et al.* (1995) quienes llevaron a cabo la cuantificación y clasificación de tamaños de bacterias de suelo a través de análisis de imagen apoyado en microscopía, a la par de Young *et al.* (1995) propusieron un sistema para la determinación automática de biomasa algal en muestras de estanque, de esta forma estimaron los niveles de crecimiento de la biomasa dentro del mismo.

Más adelante, Ranefall *et al.* (1998) llevaron a cabo una propuesta de cuantificación automática de núcleos celulares a partir del color. Álvarez *et al.* (2001) efectuaron la clasificación de diatomeas¹² utilizando técnicas de procesamiento de imágenes, basándose en el escalamiento de grises, es decir, a través de diversas tonalidades de la imagen. Y para 2002 Danckaert *et al.*, a partir de imágenes de microscopía, desarrollaron un sistema para reconocimiento de organelos intracelulares. Para ello, utilizaron una red neuronal artificial, la cual fue alimentada con un banco de imágenes, tanto para crear una base de datos para el entrenamiento del sistema, como para las primeras pruebas de reconocimiento del sistema. Y algunos años después Arámbula *et al.* (2005) establecieron un

¹² Diatomeas: Son organismos unicelulares muy abundantes en casi todos los hábitats acuáticos

protocolo para el conteo automático de células teñidas. El análisis se enfocó en el conteo e identificación de núcleos celulares utilizando bancos de imágenes para entrenar al sistema.

Con los avances en el procesamiento de imágenes Castañón *et al.* (2006) describieron un método automatizado para identificar quistes de una especie de protozooario usando imágenes digitales con un clasificador. En este caso, se tomaron en cuenta características propias del organismo como el tamaño, geometría, etc.

Pasando directamente a la aplicación de los sistemas automáticos para la identificación de huevos de helmintos, se tiene registro que en 2001 Yang *et al.*, realizaron el primer estudio donde se detectan huevos de helmintos en muestras clínicas, utilizando algoritmos computacionales con las imágenes digitales procesadas a través de clasificadores, seleccionando características de forma y tamaño. Tiempo después, Dogantekin *et al.* (2008) propusieron un sistema el cual era capaz de clasificar 16 diferentes especies de huevos de helmintos a partir de imágenes de microscopia, realizando un proceso inicial de mejoramiento de la imagen (reducción de ruido, segmentación, corrección de contraste, etc.), seguido de la obtención de características, para finalmente utilizar un proceso de reconocimiento a través de un clasificador. Posteriormente Avci y Varol (2009) desarrollaron un sistema con el que se clasificaron seis diferentes especies de helmintos utilizando sus características morfométricas como longitud, textura y forma.

Es importante mencionar que los estudios anteriormente mencionados están enfocados o bien a un tipo de estructura simple, o bien, a muestras clínicas o de Atlas de referencia médico, es decir, a muestras en donde hay una baja probabilidad de error, ya que las estructuras de interés se encuentran aisladas. Por lo cual, el presente trabajo de tesis fue una propuesta que permitiera la solución de la medición de los huevos de helmintos en muestras de agua residual, con tres diferentes calidades.

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema automático como una propuesta alternativa para la identificación y cuantificación de diferentes especies de huevos de helminto de importancia médica en muestras de agua residual.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Justificar el desarrollo de un sistema automático de identificación y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de agua residual.
- Documentar el desarrollo de los algoritmos de procesamiento de imágenes para una identificación rápida y eficiente de diferentes especies de huevos de helmintos en agua residual.
- Validar el sistema automático para la identificación y cuantificación de diferentes especies de huevos de helmintos, en tres diferentes clases de agua residual, con base en su concentración de sólidos totales.

5. ALCANCES

- Manejo de las técnicas para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de agua residual.
- Desarrollo de la capacidad en la identificación de diferentes géneros y especies de huevos de helmintos en muestras ambientales.
- Descripción de los algoritmos de procesamiento de imágenes dentro del sistema automático para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos.
- Validación internacional del sistema automático a través de los porcentajes de sensibilidad y especificidad.

6. HIPÓTESIS

El desarrollo de un sistema de procesamiento y reconocimiento digital de imágenes es una alternativa para la etapa de identificación y cuantificación de huevos de helmintos que solventa las debilidades de la técnica tradicional, tanto, en confiabilidad y tiempo de los resultados generados.

7. METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS)

Para llevar a cabo el desarrollo del sistema automático de detección e identificación de diferentes especies de huevos de helmintos se siguieron diversas etapas, las cuales fueron:

- a) Selección de diferentes especies de huevos de helmintos de importancia médica y distribución mundial a considerar en el sistema automático
- b) Establecer una base de datos de imágenes de las diferentes especies seleccionadas para la calibración del sistema automático
- c) Selección y diseño de algoritmos para el desarrollo del sistema automático
- d) Validación del sistema automático con base en el porcentaje de sensibilidad y especificidad.

7.1 Criterios para la selección de especies de huevos de helmintos

La selección de las 10 diferentes especies de huevos de helmintos incluidas para el desarrollo del sistema automático, se basó tanto en su importancia médica, como su distribución mundial. A continuación se describe cada una de las especies seleccionadas.

7.1.1 Nematodos: *Ascaris lumbricoides* (estadio fértil e infértil), *Toxocara canis*, *Trichuris trichiura*, Uncinarias (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*)

- *Ascaris lumbricoides* (estadio fértil e infértil). Es ampliamente reconocida como la especie de helminto más común y de amplia distribución mundial. Dada su importancia, se decidió no sólo identificar esta especie, sino también determinar los estadios (fértil e infértil), ya que en el segundo caso el huevo no es viable ni infeccioso, por lo que su presencia no representa ningún riesgo.
- *Toxocara canis*. La infección por *Toxocara* provoca severas afectaciones al sistema nervioso y nervio óptico. Los síntomas clínicos se observan con mayor frecuencia en niños que en adultos.
- *Trichuris trichiura*. Ampliamente distribuido, se estima que 1,049 millones de personas han sido infectadas por este parásito en alguna etapa de su vida, incluyendo a 114 millones de niños en edad preescolar y 233 millones de niños en edad escolar (Stephenson *et al.*, 2000).
- Uncinarias. (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) Se eligió dado a que ha sido reportada como la segunda infección más común a nivel mundial a causa de helmintos. La uncinariosis es un ejemplo significativo de enfermedad debilitante que causa detrimento a la economía familiar de los campesinos o personas infectadas, y, en última instancia, a la economía nacional en países donde el cultivo es una importante fuente de exportación (Botero, 1981).

7.1.2 Cestodos: *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis nana*, *Taenia solium*

- *Hymenolepis diminuta* e *Himenolepis nana*. Las hymenolepiasis constituyen la infección por cestodos más frecuente a nivel mundial, particularmente en áreas geográficas cálidas, templadas y secas en países en vías de desarrollo. En el caso particular de *H. nana* su elección representó un reto, debido a la dificultad de su identificación, inclusive para el personal entrenado, dado el tamaño (30 μm) y la transparencia de la estructura.
- *Taenia solium*. Este helminto aparte de ser un parásito cosmopolita, es endémico en toda América Latina, África, India, partes de China y el Sureste Asiático; así como en México (Biagi, 2004). La infección causada por *Taenia solium* resulta en costos significativos tanto de salud y a los relacionados con las pérdidas en la industria porcina, huésped intermediario.

7.1.3 Trematodos: *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*

- *Schistosoma mansoni*. Este helminto se eligió dado a su prevalencia mundial e importancia médica. Se estima que al menos un 90% de la población de África y Sudamérica está infectada (WHO, 2017).
- *Fasciola hepatica*. De presencia mundial, se estima que existen al menos 2.4 millones de personas infectadas en 70 países. Afecta tanto a animales vertebrados herbívoros como a humanos (WHO, 2006). En México está presente en prácticamente todo el país (Biagi, 2004).

7.2 Base de datos de imágenes de helmintos

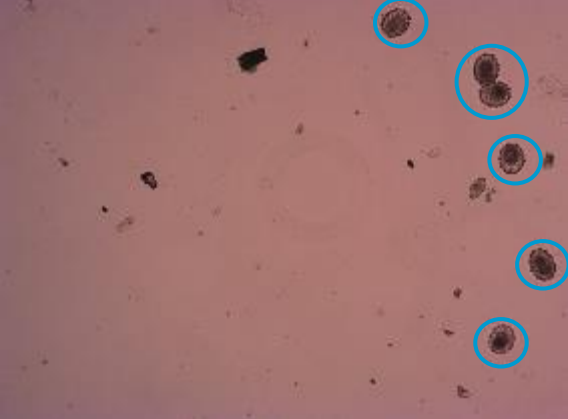





La base de datos de las especies de huevos de helmintos seleccionadas se conformó con total de 720 imágenes de alta calidad. Las imágenes fueron obtenidas de muestras de agua residual, lodo y excretas analizadas en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Ingeniería, UNAM, por el grupo de Tratamiento y Reúso. Las imágenes de *Schistosoma mansoni* se obtuvieron a través de los concentrados donados por parte de la Dra. Patricia Machado Pinto del Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil.









Las imágenes incluyeron diferentes estadios del desarrollo de los huevos de helmintos, como son huevos larvados o no larvados, así como diferencias morfológicas y variaciones en los rangos entre especies, como por ejemplo: tamaño, forma, textura, color, tipo de membrana (mamelonada o no mamelonada), etc.







El proceso de la captura de las imágenes se realizó a través de un microscopio óptico marca Carl Zeiss, modelo AxioLab A1 y una microcámara UI-1480LE-C-HQ adaptada al microscopio. Para la obtención de imágenes homogéneas se utilizaron ajustes fijos de iluminación y una resolución de 2560 x 1920 píxeles sin compresión.

En la Tabla 8 se presentan algunos ejemplos de imágenes de huevos de helmintos adquiridas para el archivo fotográfico y se detallan algunas de sus características principales.

Tabla 8. Archivo fotográfico de los huevos de helminto seleccionados

Género	Imagen ambiental	Huevo aislado	Características
<i>Ascaris lumbricoides</i> fértil			<p>Ovalado de 40 a 80 μm de largo, por 25 a 50 μm de ancho con ondulaciones en los bordes denominadas mamelones.</p>
<i>Ascaris lumbricoides</i> Infértil			<p>Ovalado, sin mamelones, aproximadamente 88 a 94 μm de largo por 39 a 44 μm de ancho, más alargado y estrecho que un huevo fértil</p>
<i>Toxocara canis</i>			<p>Esférico, diámetro aproximado de 85 a 95 μm, la membrana es gruesa con aspecto rugoso y una separación entre la membrana externa y el núcleo.</p>

<p><i>Trichuris trichiura</i></p>			<p>Aproximadamente 50 a 54 μm de largo por 23 μm de ancho, con dos prominencias translúcidas localizadas en los polos del huevo que hacen que éste se asemeje a un barril.</p>
<p>Uncinarias (<i>Necator americanus</i> <i>Ancylostoma duodenale</i>)</p>			<p>Ovalado, 60 a 76 μm de largo por 30 a 40 μm de ancho, ambas especies son similares en aspecto y tamaño, por lo que los huevos no pueden ser identificados entre especies.</p>
<p><i>Hymenolepis diminuta</i></p>			<p>Esférico de 60 a 80 μm de diámetro, tienden a tomar tonos amarillos o cafés amarillentos.</p>
<p><i>Hymenolepis nana</i></p>			<p>Ovalado, de 30 a 47 μm de largo, tiene la forma parecida a un limón, es transparente.</p>

<p><i>Taenia solium</i> y <i>Taenia saginata</i></p>			<p>Ovalado casi esférico con diámetro aproximado de 30 a 40 μm, ambas especies son similares en tamaño, presentan gruesas paredes radiales. Los huevos no pueden ser diferenciados entre las dos especies.</p>
<p><i>Schistosoma mansoni</i></p>			<p>Peculiar forma oval, de 114 a 180 μm de largo por 45 a 70 μm de ancho, con una espina lateral que sale cerca de la parte trasera. El otro extremo es ligeramente curvado.</p>
<p><i>Fasciola hepatica</i> y <i>Fasciola buski</i></p>			<p>Ovalado, 130 a 150 μm de largo y de 60 a 90 μm de ancho. Los huevos no pueden ser diferenciados entre especies.</p>

7.3 Desarrollo de algoritmos del sistema automático para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos

El desarrollo del sistema automático requirió una serie de algoritmos que incluye desde la imagen original a color con las estructuras de interés hasta la clasificación y verificación de las mismas (Figura 5). A continuación se detallan algunos de ellos.

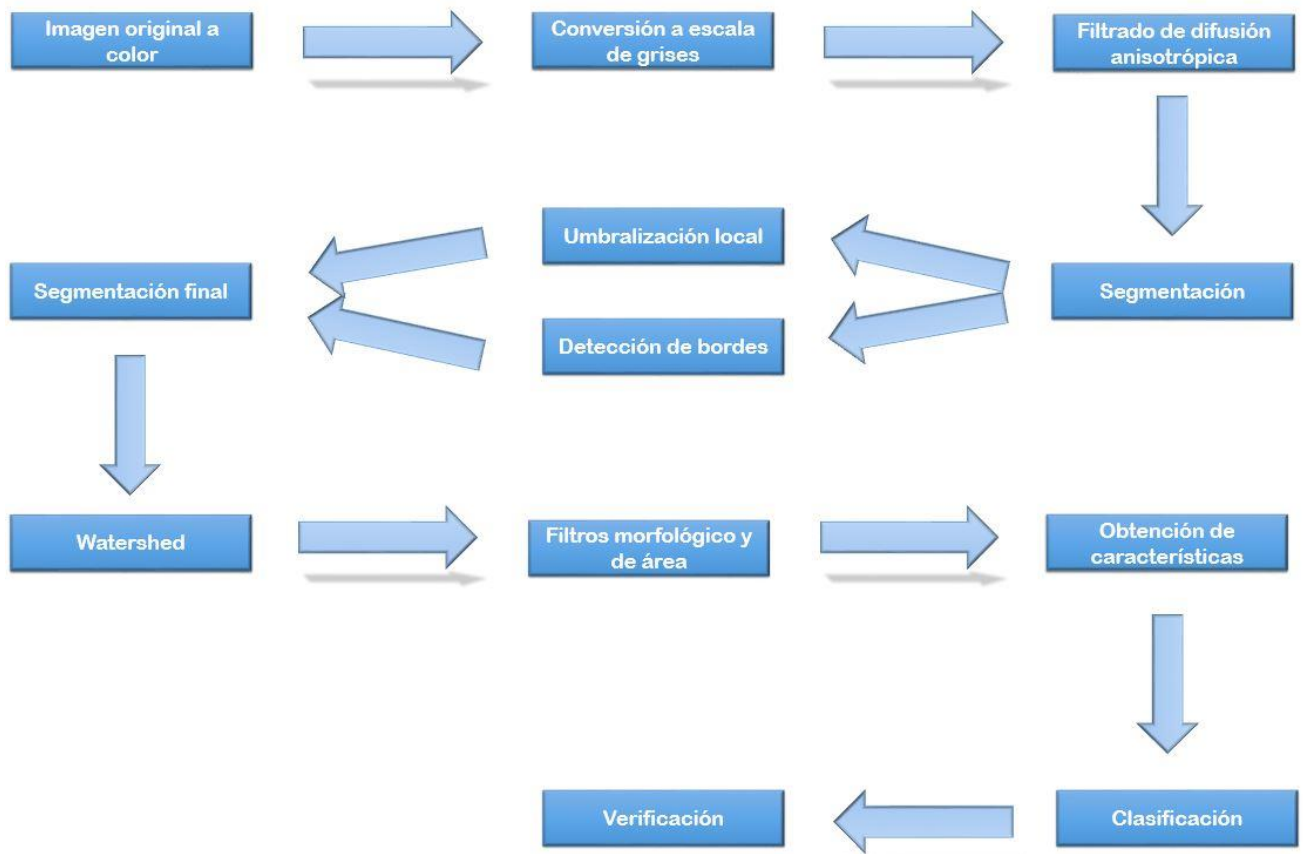


Figura 5. Diagrama de flujo del desarrollo del sistema automático

7.3.1 Imagen original a color

La primera etapa del desarrollo del sistema automático consistió en la adquisición de la imagen original a color. Como se puede observar en la Figura 6, la imagen seleccionada, que procede de una alícuota de una muestra procesada de agua residual, presenta tres huevos de la especie de *Ascaris lumbricoides* adheridos, y constituye una imagen adecuada para ejemplificar las etapas del sistema automático.



Figura 6. Imagen a color original

7.3.2 Conversión de la imagen a escala de grises

Es importante indicar que de forma previa a la conversión de la imagen a escala de grises, fue necesario aplicar un cambio al modelo de color HLS (Hue, Luminance and Saturation, por sus siglas en inglés). Lo anterior se debió a que al ser éste un modelo de representación "natural" se acerca a la percepción fisiológica del color del ojo humano (Ruru *et al.*, 2009). De esta forma, por medio de la media de los valores del canal de luz, cuyo valor se resta a los correspondientes de todos los píxeles de la imagen, se eliminaron los errores por cuestiones de carencia o deficiencia de luz en la imagen (Aristondo, 2010). En esta nueva base de color es posible definir las siguientes propiedades:

- Matiz (H): argumento en el plano perpendicular al eje axial. El matiz se puede definir como la clase de color (rojo, azul o verde) y está determinado por el valor exacto de la longitud de onda de la luz reflejada (Calvo & Durán, 1997).
- Luminancia o brillo (L): eje axial del nuevo espacio. Este atributo está relacionado con la cantidad de luz que emite el cuerpo (Platero, 2005).
- Saturación (S): módulo en el plano perpendicular al eje axial. La saturación se define como el grado de la mezcla que tenga un color puro con el blanco, o bien la fuerza o intensidad del color (Ranganna, 1986).

Posteriormente y para la conversión a escala de grises de la imagen, se realizó un promedio de las tres matrices (formadas por los valores del pixel en cada uno de los canales del modelo), obteniendo una sola matriz $m \times n$ (m columnas \times n filas), en la cual sus elementos indican el nivel de gris de cada pixel. En la Figura 7 se puede observar el resultado de la conversión de la imagen original de color a la escala de grises.

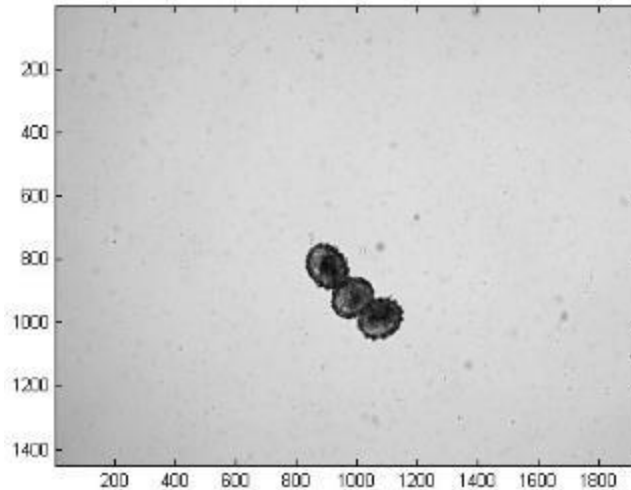


Figura 7. Imagen en escala de grises

7.3.3 Filtrado de difusión anisotrópica

El algoritmo del filtrado anisotrópico consistió en sustituir el valor original de cada pixel por otro dado por una función que varía dependiendo del módulo del gradiente, el cual proporciona la dirección y magnitud del cambio de intensidad de gris presente entre el pixel y su alrededor. Los valores de gradiente grandes corresponden a pixeles cuya intensidad es notablemente diferente a la de alguno de sus vecinos, el cual pertenece a un borde. Por el contrario, un gradiente pequeño significa que la intensidad del pixel y la de sus vecinos no son muy diferentes entre sí, correspondiendo a una región más uniforme. Para la difusión buscada, se valoró la diferencia de intensidad entre el píxel analizado y sus vecinos, y se proporcionó un valor nuevo que tiende a igualarlo con su entorno (difuminarlo), en una proporción más grande, si el gradiente es pequeño (región homogénea), y en una proporción menor si el gradiente es grande (borde) (Fernández, 2013).

A través del filtrado de difusión anisotrópica fue posible reducir, e incluso eliminar, el ruido de la imagen. Éste se presenta cuando el valor de un pixel no corresponde con la realidad o se presenta en tonos de grises sin congruencia, debido, posiblemente, a los equipos electrónicos utilizados para capturar la imagen y/o a las interferencias a la hora de transmitir los bits¹³ de información, logrando un “suavizado” de la imagen, pero preservando los bordes (Perona & Malik, 1990).

La difusión anisotrópica (I_t) propuesta por Perona y Malik (1990) está dada de la siguiente manera:

$$\frac{\delta I_t}{\delta t} = \text{div}[c(x, y)\nabla I(x, y)] = \nabla c \cdot \nabla I + c(x, y, t)\Delta I \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde div es el operador de divergencia,

Δ es el operador Laplaciano

¹³ Bit: Unidad mínima de información

∇ es el operador gradiente

$c(x, y, t)$ es el coeficiente de difusión definido en función del gradiente de tal forma que se adapte para que los bordes entre regiones se preserven y los detalles intra-regiones sean suavizados.

En la Figura 8 se observa como después de aplicar el proceso de filtrado anisotrópico la imagen es más nítida, pudiendo diferenciar de mejor manera el borde de los objetos con respecto a la Figura 7.

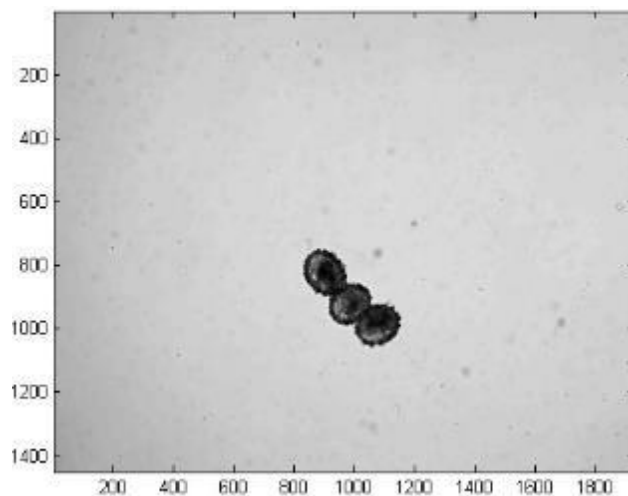


Figura 8. Imagen después de la aplicación del filtro anisotrópico

7.3.4 Segmentación

Con el propósito de que la segmentación (binarización) de los objetos en la imagen fuera lo más precisa posible, la imagen se procesó por dos diferentes métodos para después utilizar ambos resultados y conjuntarlos en la segmentación final.

7.3.4.1 Mediante umbralización local

La umbralización es una técnica efectiva para obtener la segmentación de imágenes, donde estructuras diferentes tienen intensidades contrastantes u otras características diferenciables (Coto, 2003). Debido a esto, en esta etapa se definió el umbral que permitió diferenciar un objeto del fondo, y para lo cual se empleó el algoritmo de Sauvola (Sauvola & Pietikäinen, 2000).

7.3.4.1.1 Algoritmo de Sauvola

El algoritmo de Sauvola permitió variar el umbral $t(x, y)$ a través de la imagen, este umbral t es calculado basado en una media $m(x, y)$, y una desviación estándar $s(x, y)$ del histograma de intensidades local en una ventana $n \times n$ centrada en el pixel (x, y) , agregando una variable importante en el cálculo del umbral que es el rango dinámico de la desviación estándar R . A continuación se muestra el algoritmo matemático de Sauvola:

$$t(x, y) = m(x, y) \left[1 + k \left(\frac{s(x, y)}{R} - 1 \right) \right] \quad (\text{Ecuación 2})$$

El algoritmo de Sauvola tiene como principio analizar el contraste de la imagen; si la imagen presenta un contraste local alto, como en el caso de las imágenes del microscopio óptico empleado, el umbral calculado con este algoritmo tendrá un valor cerca del valor de la media, debido al efecto que tiene la R y la k ; al contrario, si la imagen presenta un contraste bajo, el umbral calculado estará por debajo del valor de la media, en una cantidad proporcional a la de la desviación estándar local normalizada.

De esta forma, y teniendo el umbral definido con la ecuación anterior, la imagen segmentada se calculó como:

$$g(x, y) = \begin{cases} 255 & \leftrightarrow f(x, y) > t \\ 0 & \leftrightarrow f(x, y) \leq t \end{cases} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde $f(x, y)$ es la imagen de entrada y $g(x, y)$ corresponde a la imagen ya segmentada. Asignándole 255 a los píxeles de los objetos (blanco) y 0 a los píxeles del fondo (negro).

Esta ecuación se evaluó para todos los píxeles de la imagen, y un umbral diferente se calculó para cada coordenada (x, y) usando los píxeles en el vecindario.

Visualmente y como resultado de la umbralización, los píxeles pertenecientes a objetos fueron etiquetados en un color blanco, mientras que los píxeles pertenecientes al fondo en negro (Figura 9).

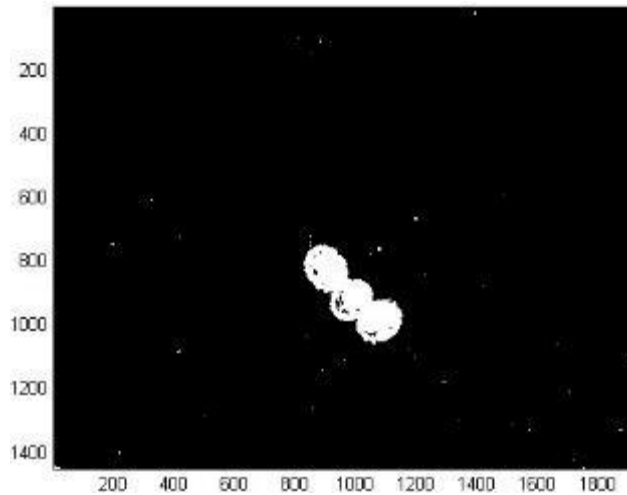


Figura 9. Imagen binarizada por umbralización local (algoritmo de Sauvola)

A continuación se aplicó un operador morfológico de cerradura el cual permitió fusionar estrechas discontinuidades, unir componentes conexas cercanas, eliminar huecos pequeños y llenar los espacios pequeños en el contorno (Figura 10).

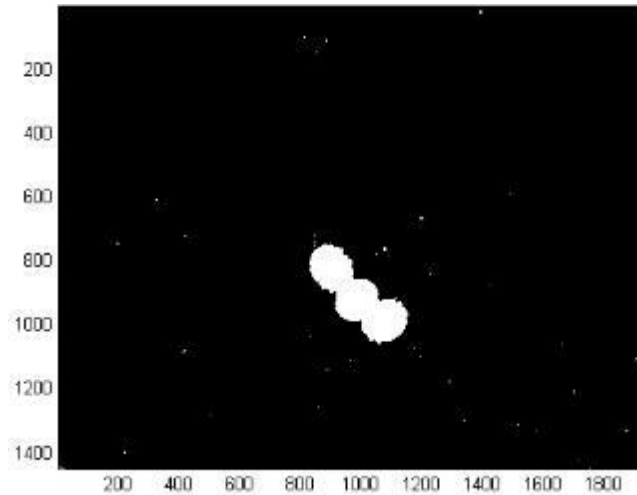


Figura 10. Imagen afectada por el filtro morfológico de cerradura

7.3.4.2 Mediante detección de bordes

La detección de bordes permitió detectar cambios abruptos de intensidad y con ello definir los objetos con mayor nitidez, resaltando así las características de sus bordes, al identificar los píxeles de borde de cada objeto (píxeles en los cuales la intensidad de la función de la imagen cambia abruptamente). Los filtros seleccionados para la detección de bordes en el desarrollo del sistema se describen a continuación.

7.3.4.2.1 Laplaciano de un Filtro Gaussiano

El filtro Gaussiano se seleccionó con la finalidad de eliminar el ruido en las imágenes, a través de éste se llevó a cabo la difuminación de la imagen, lo que redujo la intensidad de las estructuras (incluyendo el ruido). El valor de cada punto fue el resultado de promediar ponderadamente los valores vecinos a ambos lados de dicho punto, dando mayor peso al valor del píxel central y a los píxeles que se encontraban cercanos a éste y menor peso a los píxeles más alejados (Gonzalez & Woods, 1993).

El Laplaciano, permitió resaltar las regiones donde hay cambios bruscos de intensidad y desenfatar aquellas con una lenta variación en niveles de intensidad. El motivo de la aplicación del algoritmo del Laplaciano a un Filtro Gaussiano fue dado porque este último reduce su sensibilidad al ruido, permitiendo una enfatización de los bordes óptima. Con la desviación estándar Gaussiana σ y sean x y y las coordenadas del píxel en análisis, el Laplaciano de un filtro gaussiano se denota como función LoG y corresponde a la siguiente ecuación:

$$LoG(x, y) = -\frac{1}{\pi\sigma^4} \left[1 - \frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} \right] e^{-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

En la Figura 11 se muestra el ejemplo de la aplicación del filtro LoG en la imagen en escala de grises, donde los bordes de los objetos se enfatizan.

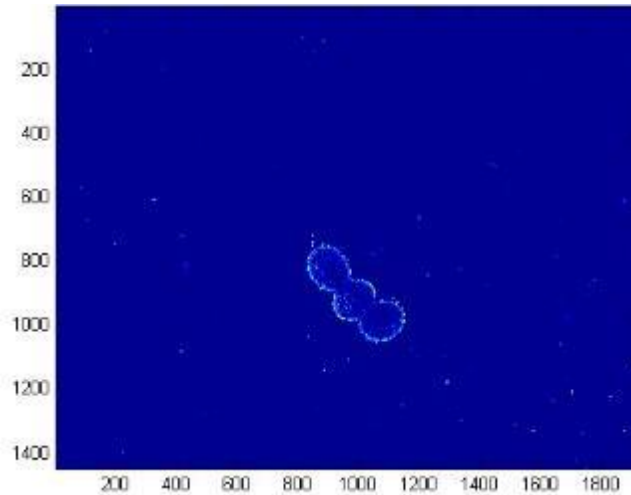


Figura 11. Imagen después de la aplicación del filtro LoG

7.3.4.2.2 Umbralización del Laplaciano del filtro Gaussiano

El objetivo de la umbralización de la imagen seleccionada, después de haber aplicado el filtro LOG, fue el conservar los bordes que mantuvieran continuos a los objetos. El umbral se eligió en función de cierto tamaño de píxeles de borde con el propósito de eliminar a aquellos que no fueran de interés y enfatizar los que se utilizarían para la segmentación posterior de los objetos.

En la Figura 12 se puede apreciar la umbralización de la imagen obtenida, donde se observan los contornos de los objetos bien definidos, así como pequeños objetos dispersos en la imagen, los cuales serían eliminados de forma posterior al hacer la intersección entre esta imagen y la resultante de la binarización por umbralización local.

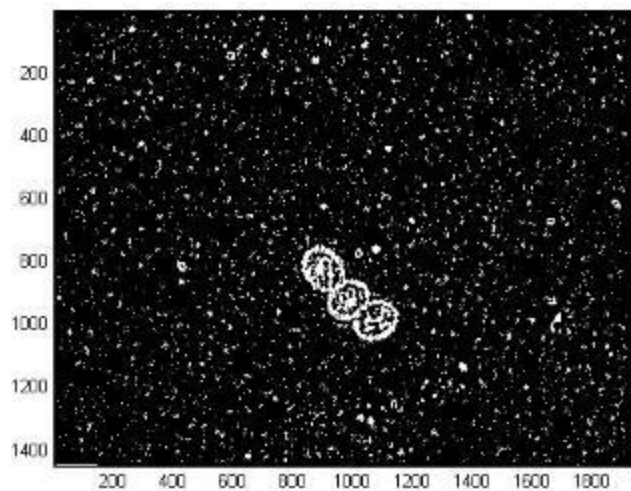


Figura 12. Imagen umbralizada después de la aplicación del algoritmo LoG

7.3.4.3 Segmentación final

La segmentación final se obtuvo considerando como correctos sólo a los píxeles comunes en ambas segmentaciones, utilizando un operador de intersección entre las dos imágenes resultantes, después del proceso completo de binarización por umbralización local y binarización por detección de bordes. Como se muestra en la Figura 13, los objetos de la imagen están claramente definidos, y es el resultado de combinar las Figuras 10 y 12.

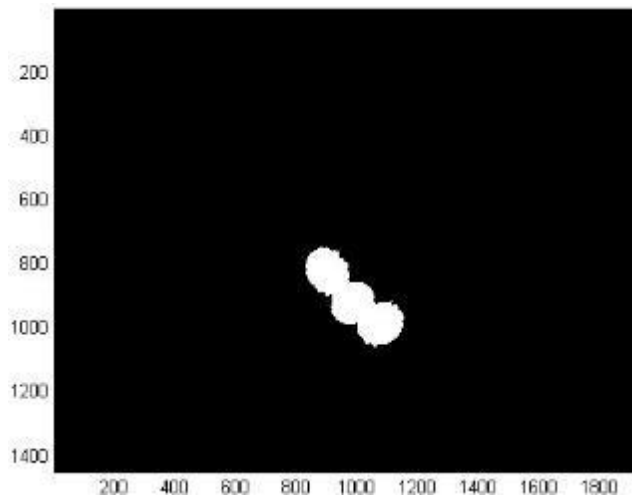


Figura 13. Imagen final resultante de la segmentación

7.3.5 Transformada de Watershed

Para comprender la función Watershed, las imágenes deben entenderse como una función tridimensional, es decir, como una superficie con relieve. Cada punto de la imagen se encuentra a una cierta altura, de esta forma una imagen en escala de grises puede interpretarse como la imagen topográfica de un relieve terrestre, donde las intensidades de mayor valor corresponden con las montañas, y las menores con los valles (Fernández, 2013). El método se basa en lo que ocurriría si la superficie se inundase.

Cuando la topografía entera es inundada desde abajo para dejar al agua elevarse con una proporción uniforme (algoritmo de inundación), y cuando en las distintas cuencas de captación el agua está a punto de combinarse, un dique es fabricado para impedir la fusión. Entonces la inundación alcanzará finalmente un paso cuando sólo las partes superiores sean visibles sobre la línea de agua. Estos límites de dique corresponden a las líneas divisoras de los Watersheds. Por lo tanto, son los límites (continuos) extraídos por este algoritmo de segmentación, los que ayudaron en el desarrollo del sistema para separar cada uno de los objetos (Prados, 2006).

En la Figura 14 se puede observar la imagen después de haber pasado por la segmentación por Watershed, en ella es posible observar como el algoritmo realizó la separación de los tres objetos.

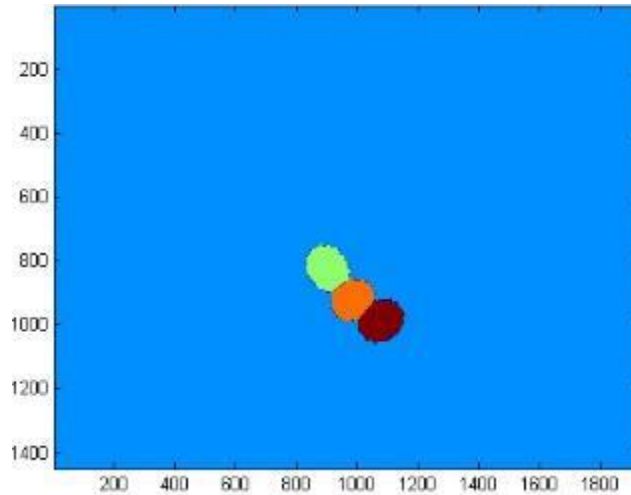


Figura 14. Imagen obtenida después de la aplicación del algoritmo Watershed

7.3.6 Filtros morfológico y de área

Con el propósito de reducir el número de objetos procesados por el clasificador, se aplicó a las imágenes los filtros morfológico y de área, los cuales tuvieron como objetivo:

La función del filtro morfológico fue eliminar aquellas formas que son más largas o más delgadas que el rango de los objetos de interés (huevos de helmintos). Esto es posible al comparar la relación entre la longitud del eje mayor y el eje menor, todos los objetos que se localicen afuera de la media (± 2) desviaciones estándar de la distribución de todos los huevos serían automáticamente descartados.

La función del filtro de área fue eliminar aquellas estructuras fuera del rango de área de los huevos, objetos muy grandes o muy pequeños son automáticamente descartados. De esta forma los objetos fueron clasificados en dos grupos: aquellos identificados como posibles huevos de helmintos de las especies seleccionadas y el detritus, que pueden ser burbujas, polen, esporas, basura orgánica, grasa, levadura, restos celulares, flóculos bacterianos, cristales, etc.; los cuales son frecuentemente confundidos y cuantificados como huevos de helmintos por los técnicos poco capacitados.

Continuando con el ejemplo de la imagen representada por los tres huevos de la especie de *Ascaris lumbricoides* (Figura 15), y después de la aplicación de los filtros morfológico y de área, fue posible observar los tres objetos que se encuentran dentro del rango de área y forma, y que por lo tanto, el algoritmo deja intactos. Otro caso que lo ejemplifica de forma más clara se puede observar en las Figuras 16 y 17, donde algunos de los elementos son eliminados de la imagen después de los filtros, ya que no cumplen con los rangos establecidos para la propiedad de forma o área.

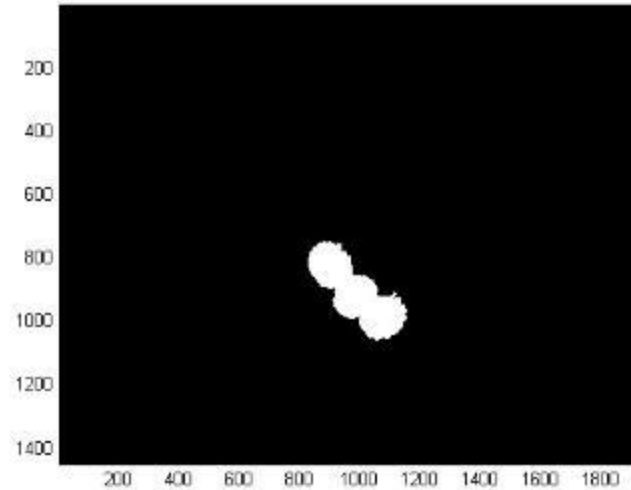


Figura 15. Imagen con la aplicación del Filtro de área

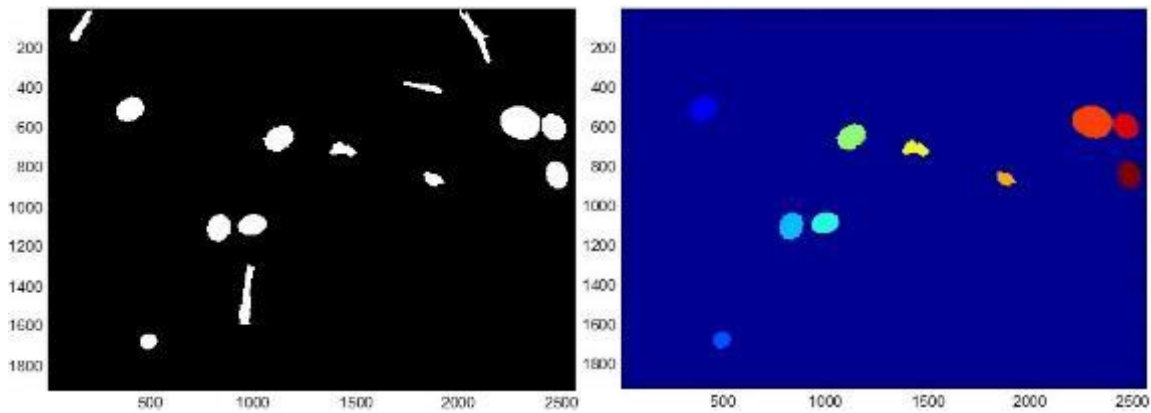


Figura 16. Imagen después de aplicado el algoritmo Watershed. Figura 17. Imagen después de aplicados los filtros morfológico y de área

7.3.7 Obtención de características

Una vez que la imagen de los objetos detectados fue procesada, se procedió a establecer y obtener las características esenciales para su clasificación, cuya combinación permitió distinguir si el objeto era un huevo de helminto o no, y a que especie de helminto en particular correspondía.

A este respecto, básicamente se distinguen 3 tipos diferentes de características: Forma, Nivel de gris y Textura. A continuación se describen algunas de ellas.

7.3.7.1 Forma

7.3.7.1.1 Área:

El área de un objeto se define como el número de píxeles (bajo conectividad 8) que lo forman, multiplicado por la escala a la cual se le observa, es decir, el tamaño asociado al píxel.

La conectividad entre píxeles es un concepto utilizado para establecer los límites de los objetos y regiones de los componentes en una imagen. Para establecer la conectividad entre dos píxeles, es necesario determinar si son adyacentes, lo cual sucede cuando si, y solo si, tienen en común una de sus fronteras, o al menos una de sus esquinas (Figura 18). En el caso de la conectividad 8, corresponde a buscar conectividad en los píxeles en un vecindario correspondiente a las 8 direcciones posibles (Figura 19).



Figura 18. Adyacencia entre píxeles a) Fronteras b) Esquinas (Carcedo y Franco, 2004)

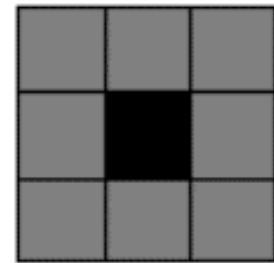


Figura 19. Conectividad 8

Para determinar la conectividad de los píxeles, además de confirmar su adyacencia, se tiene que cumplir con que su nivel de gris (de ambos píxeles) satisfaga un criterio especificado, en este caso se definirá la conectividad solo si los píxeles adyacentes tienen un valor correspondiente al asignado a los objetos.

El tamaño asociado al píxel, se obtiene con el uso de reglillas (Figura 20), para obtener la equivalencia píxel-micra. Con las imágenes adquiridas por el Grupo de Tratamiento y Reúso en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental, del Instituto de Ingeniería de la UNAM, se observó una relación de: 1 píxel = 0.4348 μm (micras).

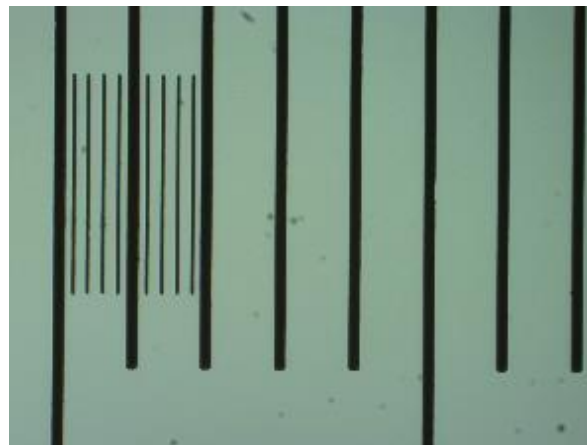


Figura 20. Reglilla (los espacios pequeños equivale a 20 μm , mientras que los espacios más amplios equivalen a 100 μm)

En la Figura 21 se puede apreciar las magnitudes de área de un huevo de *Hymenolepis diminuta* con la reglilla como referencia, mide alrededor de $80 \mu m$ promedio mientras que en la Figura 22 se observa un huevo de la especie de *Fasciola hepatica* que ronda los $150 \mu m$. En el Anexo 2 se muestran diagramas de los diferentes tamaños y formas de varias especies de huevos de helmintos.

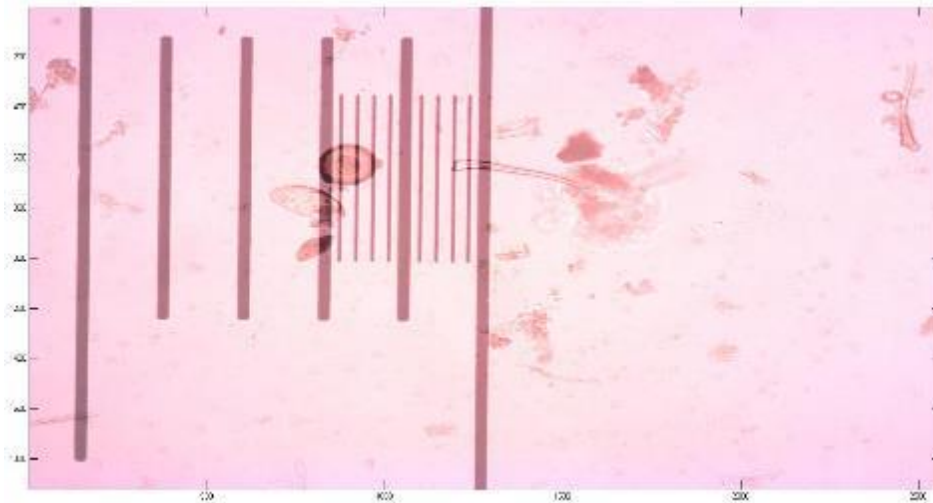


Figura 21. Huevo de *Hymenolepis diminuta* con reglilla

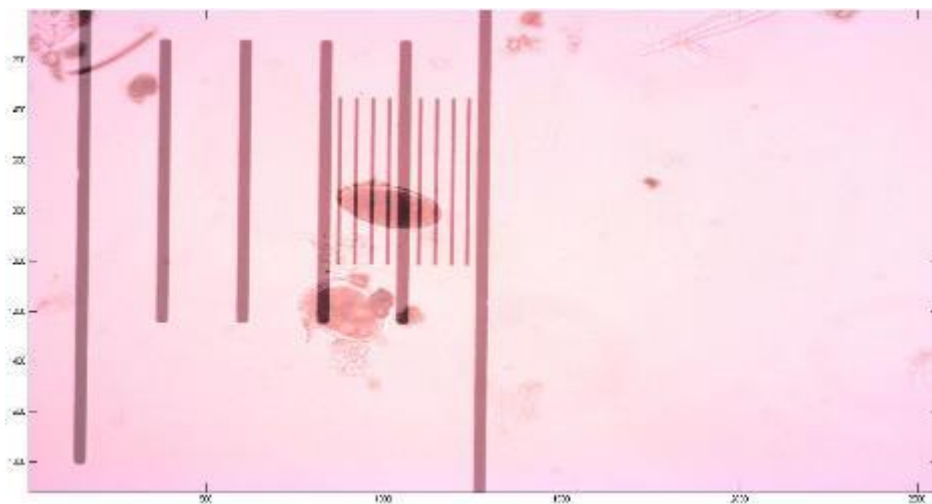


Figura 22. Huevo de *Fasciola hepatica* con reglilla

7.3.7.1.2 Perímetro:

El perímetro se define como la aproximación más simple, y consiste en calcular el número de píxeles de borde de la imagen. En la Figura 23 se puede observar la proporción de perímetros de dos diferentes especies de huevos de helminto, *Hymenolepis diminuta* y *Schistosoma mansoni*.



Figura 23. Perímetro de huevo de *Hymenolepis diminuta* (izquierda) y *Schistosoma mansoni* (derecha)

7.3.7.1.3 Excentricidad:

La excentricidad es una medida de la elongación de un objeto; un círculo, por ejemplo, tiene una excentricidad igual a uno. La operación para obtener este descriptor de forma está basada en transformaciones de distancia de borde a borde del objeto (Wahl, 1983). Se obtiene la distancia $d_{rr}(i,j)$ de la línea recta que pasa por cada pixel $p(i,j)$ del objeto y que va de borde a borde del mismo. En cada pixel del objeto se anota entonces la longitud máxima y la mínima; a partir de aquí se define la excentricidad promedio que proporciona una medida de cuánto se aparta la forma de un objeto con respecto a un círculo y donde $\max[d_{rr}^{max}]$ es el máximo valor de las distancias máximas y $\max[d_{rr}^{min}]$ es el máximo de las distancias mínimas (Fernández & Rivas, 2007; Lira, 2010)

$$\epsilon = \frac{\max[d_{rr}^{max}]}{\max[d_{rr}^{min}]} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En la Figura 24 se puede apreciar que la relación entre el $\max[d_{rr}^{max}]$ y el $\max[d_{rr}^{min}]$ es mayor en un huevo de *Trichuris trichiura* a la de un huevo de *Taenia solium* y por lo tanto, también, su excentricidad.

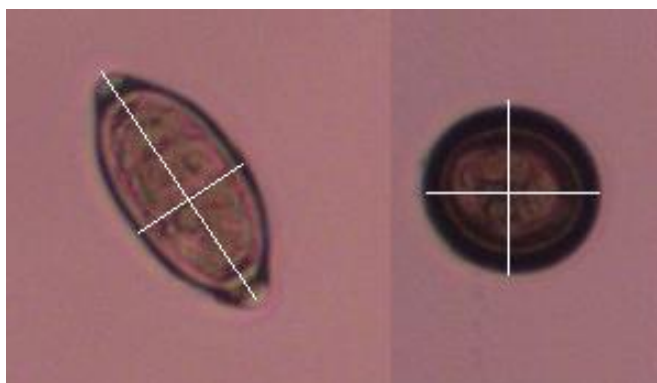


Figura 24. Ejemplificación de las excentricidades de un huevo de *Trichuris trichiura* (izquierda) y un huevo de *Taenia solium* (derecha)

7.3.7.2 Textura

7.3.7.2.1 LBP

LBP por sus siglas en inglés (Local Binary Pattern) es un descriptor de textura de escala de grises, el cual caracteriza la estructura local de la imagen, es un descriptor simple pero eficiente que etiqueta los píxeles de una imagen analizando su vecindario, estudiando si el nivel de gris de cada píxel supera un determinado umbral y codificando dicha comparación mediante un número binario (Guo *et al.*, 2010).

Por cada píxel que se encuentren en un radio R a partir del píxel de estudio debe determinarse si el valor de intensidad es mayor o menor que el valor de intensidad del píxel P , en caso de ser mayor, se asigna un "1" a esa posición de vecindad o de lo contrario se asigna un "0". Con esos valores asignados se codifica una cadena binaria por píxel. El algoritmo que representa el proceso explicado con anterioridad es el siguiente:

$$LBP_{P,R} = \sum_{p=0}^{P-1} s(g_p - g_c) 2^p, \quad s(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x \geq 0 \\ 0 & \text{si } x < 0 \end{cases} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde P es el número de vecinos que se van a considerar, R es el tamaño del vecindario, g_c y g_p son los valores de nivel de gris del píxel central y cada uno de los P píxeles del vecindario respectivamente. En la Figura 25 se puede apreciar de manera esquemática el cálculo del LBP de un píxel cualquiera con $P=8$ y $R=1$.

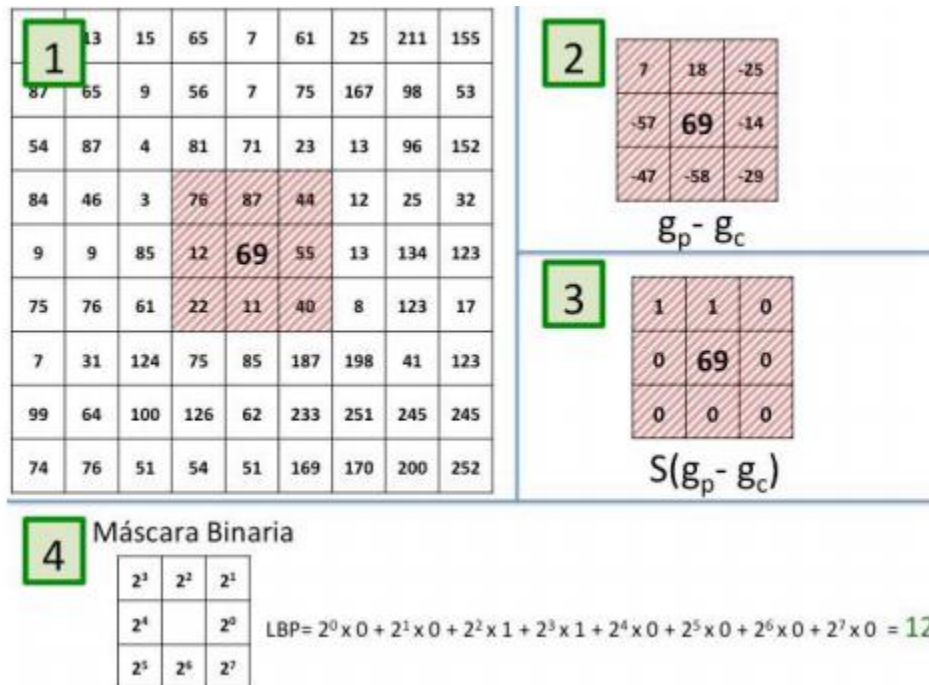


Figura 25. Esquema de los pasos necesarios para obtener el valor de LBP de un píxel (García-Olalla & Alegre, 2013)

Para el caso de los LBP calculados en el sistema se empleó un R de 4 píxeles que corresponde a un $P=17$ y un R de 8 píxeles el cual corresponde a un $P=25$. En la Figura 26 se observa la tendencia del LBP8 promedio para cada clase de huevo, en donde el eje X es el valor decimal de la cadena binaria de cada píxel del objeto (el número binario se convierte en su correspondiente decimal), y el eje Y será el número de repeticiones de esa determinada cadena binaria de los píxeles que componen al objeto.

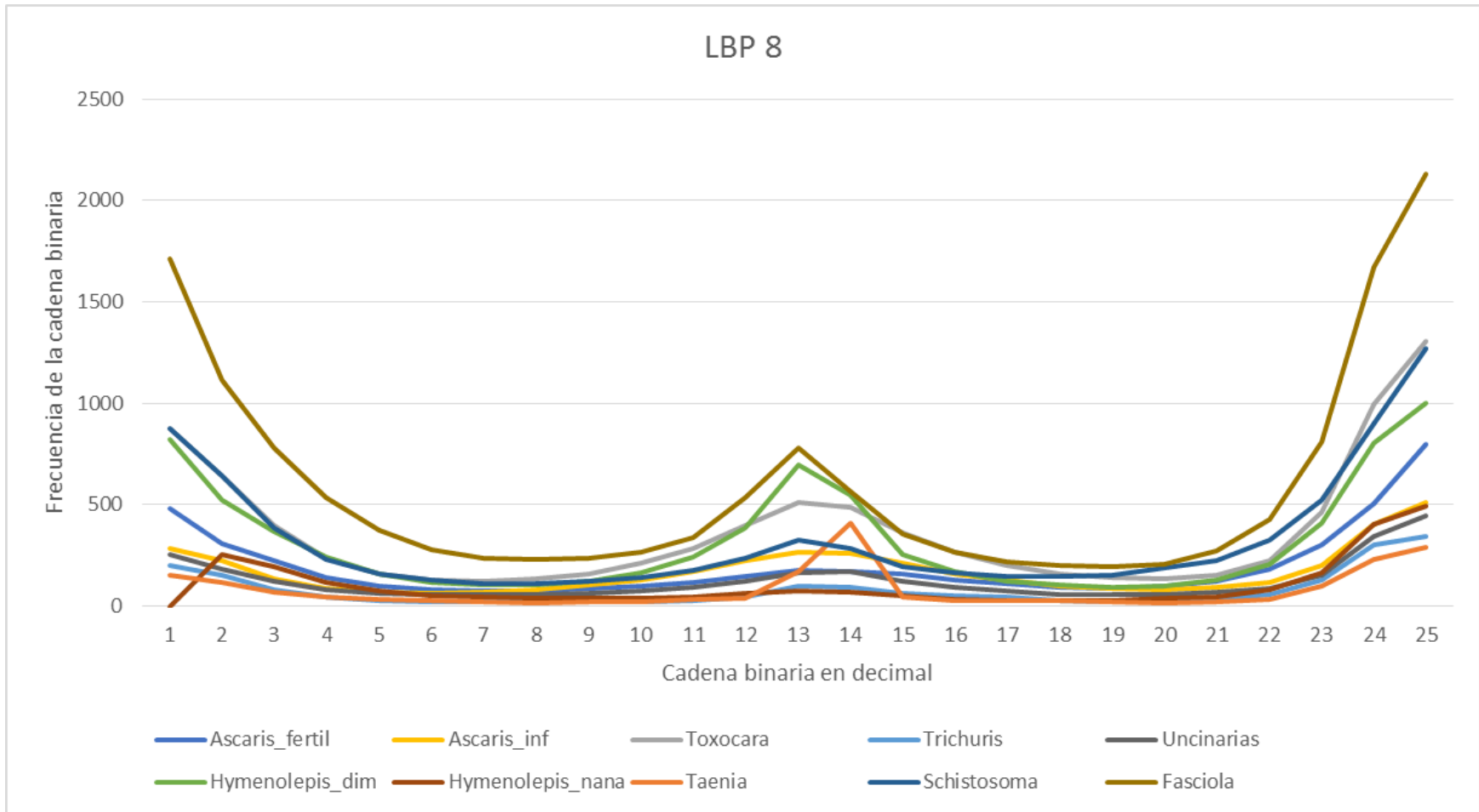


Figura 26. Gráfica del comportamiento de la característica LBP8 para diferentes especies de huevos de helmintos

7.3.8 Clasificador

Existen dos tipos principales de técnicas de reconocimientos de patrones:

- Métodos de clasificación basados en aprendizaje supervisado
- Métodos de clasificación usando técnicas no supervisadas

La clasificación supervisada es conocida como clasificación con aprendizaje, y se basa en la disponibilidad de casos de entrenamiento. Se trata de casos en los cuales se conoce a priori la clase a la que pertenecen y que servirán para generar una signature característica de cada una de las clases. Este tipo de clasificación fue la empleada en el sistema automático desarrollado, ya que de antemano expertos identificaron las imágenes de la base de datos con las que el sistema automático fue entrenado. En la Figura 27 se puede apreciar un diagrama donde se explica el proceso de aprendizaje del clasificador.

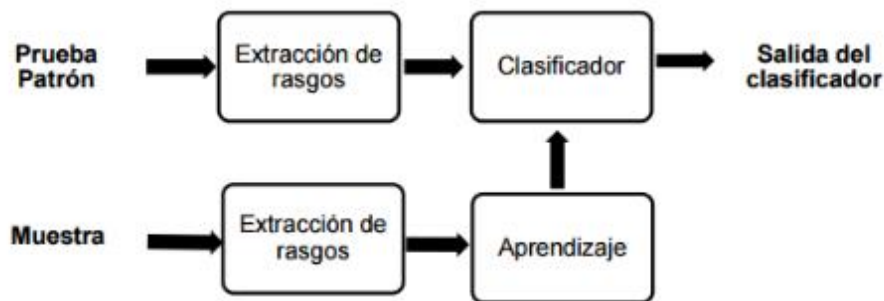


Figura 27. Diagrama de flujo de una decisión teórica de un clasificador

7.3.8.1 Clasificador KNN (*k* vecinos)

El clasificador KNN (K-Nearest Neighbors, por sus siglas en inglés) es uno de los algoritmos de aprendizaje supervisado más conocidos en la clasificación de patrones. La clasificación mediante este algoritmo proporciona reglas basadas en métodos no paramétricos para la manipulación de un conjunto de datos (Duda *et al.*, 1973).

La idea general de la aplicación del algoritmo KNN fue encontrar un grupo de *k* objetos en el conjunto de entrenamiento que estuvieran más cerca del objeto de prueba y basar la asignación de una etiqueta en el predominio de una clase particular en este vecindario (Chinea, 2016). Los datos pueden ser escalares o vectores multidimensionales (como fue este caso), debido a que los elementos de los vectores eran los valores de las características normalizadas (ya fueran características clásicas [forma y nivel de gris] o de textura [LBP 4 y 8]).

Cada uno de los datos de entrenamiento, como se mencionó anteriormente, consistió en una serie de vectores y una etiqueta de clase asociada con cada vector. En base a las características de los vectores se determinó el valor del número *K*, el cual determina cuantos vecinos influyeron en la clasificación. Se determinó utilizar 5 vecinos para las características clásicas, y 3 vecinos para cada uno de los descriptores de textura. En resumen al clasificador se le dan las características de los objetos, previamente los valores de estas características fueron normalizados para darles el mismo peso a cada una. Cuando un objeto nuevo es introducido, el sistema obtiene sus características y las normaliza, construye un vector con ellas del cual se obtendrán las distancias de ese vector a cada

uno de los vectores de los ejemplos de entrenamiento para conocer a los vecinos más cercanos, clasificando al nuevo objeto en la especie de la cual sean mayoría sus vecinos, si sucede que se tenga un empate en las especies, el clasificador escogerá siempre la clase del vecino más cercano.

7.3.9 Verificación de la clasificación

Finalmente, la verificación del resultado del clasificador se realizó de la siguiente forma: si tres de las características del objeto se encontraban fuera de la media (± 2) desviaciones estándar, la clasificación del huevo no sería considerada confiable y la clase del objeto era definida como “no es un huevo”.

Con este último paso del proceso para la clasificación de los objetos, se garantizó que solo los objetos que se encontraban dentro del umbral de las características de las imágenes de entrenamiento (forma, nivel de grises, textura, etc.), para las diferentes especies de helmintos, eran considerados como huevos.

Un ejemplo de la verificación se observa en la Figura 28, donde el clasificador indicó que el objeto identificado es un huevo del grupo de las Uncinarias.



Figura 28. Objeto clasificado como huevo del grupo de las Uncinarias (Hookworm en inglés)

7.4 Preparación de muestras para la evaluación del sistema

La evaluación del desempeño del sistema automático desarrollado, se llevó a cabo empleando tres diferentes calidades de agua residual, de acuerdo a su contenido de sólidos totales: a) Clase I, agua residual tratada con bajo contenido de sólidos totales (<15 mg/L ST), b) Clase II, agua residual tratada hasta un tratamiento secundario (>15 mg/L ST, <150 mg/L ST) y c) Clase III, agua residual sin tratamiento con un contenido > 150 mg/L ST (Anexo 3). Las diferentes calidades de agua fueron procesadas aplicando la metodología establecida en la NMX-AA-113-SCFI-1999, la cual contempla tres pasos de concentración y limpieza: filtración, flotación y sedimentación. La etapa de flotación, que involucra separar, lo más posible, a los huevos del detritus se efectuó añadiendo 150 mL de una solución saturada de Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$) con una gravedad específica de 1.3. El sobrenadante se centrifugó a 600 g, y el sedimento final fue recuperado.

Un total de 30 huevos de cada una de las especies seleccionadas fueron adicionados al sedimento para cada uno de los tres tipos de calidades de agua residual, el cual fue transferido a una Cámara Sedgwick Rafter de 1000 μl de dimensiones 50 x 20 mm y 1 mm de profundidad, y a partir de la cual las imágenes originales a color fueron adquiridas.

Para la evaluación del desempeño, se hizo un análisis comparativo, en paralelo, entre los resultados obtenidos por un equipo de cuatro técnicos expertos empleando la identificación y cuantificación por el método tradicional *versus* a los obtenidos por el sistema automático. Para este propósito dos parámetros estadísticos fueron utilizados: Sensibilidad y Especificidad.

La Sensibilidad, se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un huevo de helminto en la especie que le corresponde, es decir, la capacidad del clasificador para detectarlo. La Sensibilidad varía de 0 a 100%, cuanto más alto sea su valor numérico, mayor será la capacidad del sistema automático desarrollado para detectar y clasificar correctamente a los huevos de helmintos.

La sensibilidad se calculó en base a la siguiente ecuación

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde: *VP*: verdaderos positivos, huevos de helmintos clasificados como huevos.

FN: falsos negativos, huevos presentes pero que no fueron detectados o clasificados de forma correcta.

La Especificidad, es la probabilidad de clasificar correctamente cuando no se trata de huevos de helmintos, es decir, toda aquella basura o detritus como polen, burbujas, etc. La especificidad toma valores de 0 a 100%. Cuanto más alto sea su valor numérico, mayor capacidad para detectar otros artefactos que no sean huevos de helmintos.

La Especificidad se calcula de la siguiente forma.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde: *VN*: verdaderos negativos objetos clasificados como como basura y realmente lo es

FP: falsos positivos la basura u objetos ajenos se clasifican como huevos

Cabe aclarar que durante cualquier proceso de diagnóstico se encuentran cuatro posibilidades:

- Verdaderos positivos (*VP*): el huevo de helminto está presente y se clasifica adecuadamente (Figura 29).

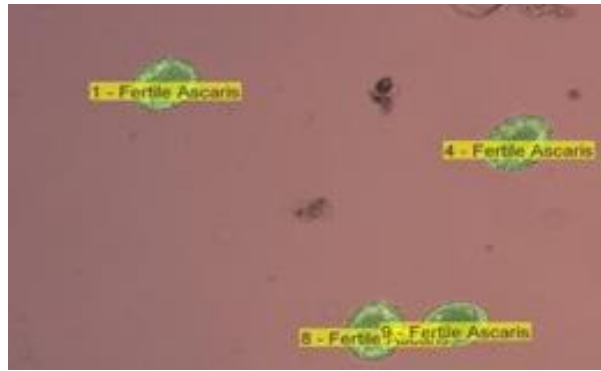


Figura 29. Huevos de *Ascaris lumbricoides* clasificados correctamente

- Falsos positivos (FP): el huevo de helminto no está presente y basura se clasifica incorrectamente como huevo de helminto (Figura 30).



Figura 30. Basura clasificada como *Ascaris lumbricoides* fértil

- Verdaderos negativos (VN): Objetos ajenos a los huevos son clasificados correctamente como "no huevos" (Figura 31).



Figura 31. Presencia de basura que es clasificada correctamente como "no huevo"

- Falso negativo (FN): El huevo de helminto está presente pero no se detecta o bien se clasifica como una especie diferente (Figura 32).

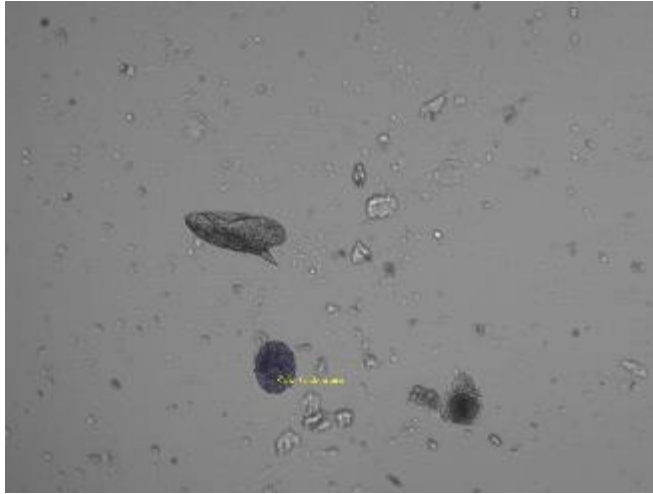


Figura 32. Imagen con presencia clara de un huevo de Schistosoma mansoni que no es detectado

8. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la evaluación del sistema automático para las diferentes calidades de muestras de agua residual fueron los siguientes:

Clase I: Para imágenes de muestras de agua residual para riego agrícola (<15 mg/L ST) se obtuvieron porcentajes de Sensibilidad y de Especificidad del 100 %. Es importante recalcar que este tipo de muestras corresponden a efluentes de plantas de tratamiento de agua residual, los cuales atraviesan por un proceso de filtración terciario y deberían de cumplir con el límite máximo de huevos de helmintos establecido por normatividad para su reuso agrícola (<1HH/L).

Clase II: Para muestras de agua residual con bajo contenido de sólidos <150 mg/L de ST, los porcentajes de Sensibilidad y Especificidad fueron de 98 y 99%, respectivamente, lo cual indica la eficiencia del algoritmo aún para este tipo de muestras ambientales. Esta clase de agua proviene de un efluente de tratamiento primario, ya sea biológico o un proceso fisicoquímico, comúnmente esta agua solo cumple con los requerimientos para riego de cultivos cocinados antes de consumirse (riego restringido) o no cumple con los requerimientos de las normas para agua de riego agrícola.

Clase III: Para muestras de agua residual con alto contenido de sólidos (> 150 mg/L de sólidos totales), el porcentaje de Sensibilidad del sistema fue de 93%, mientras que la Especificidad alcanzó un 89%. Es importante mencionar que con las técnicas tradicionales en la etapa de observación directa al microscopio óptico, este tipo de muestras, ocasiona dificultades debido a la frecuente sobre posición de detritus, lo que en ocasiones obliga a requerir un proceso adicional de dilución del sedimento final antes de su lectura. El riego con agua residual cruda representa un peligro latente de infección al no cumplir con las normas establecidas para los patógenos de interés, particularmente en los países en desarrollo (Jiménez *et al.*, 2016; Jiménez & Maya, 2007; Navarro *et al.*, 2015)

En la Figura 33 se observan los porcentajes de Sensibilidad y Especificidad para cada una de las diferentes clases de agua. Tales resultados sugieren que el Sistema Automático es una alternativa real en la Ingeniería Ambiental para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de agua residual con diferentes calidades, lo que representa ya en si una ventaja a los estudios realizados con muestras clínicas o con estructuras de Atlas, realizados por Yang *et al.* (2001); Dogantekin *et al.* (2008) y Acvi & Varol (2009).

EVALUACIÓN DEL SOFTWARE

■ Sensibilidad ■ Especificidad

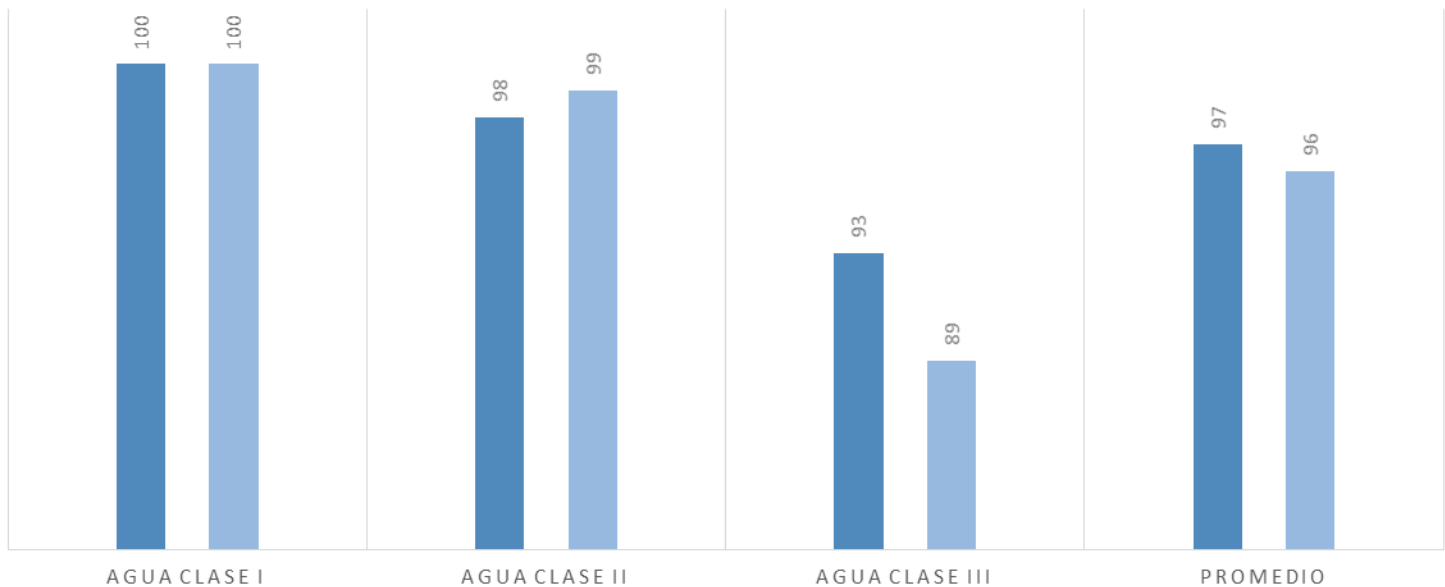


Figura 33. Resultados de sensibilidad y especificidad del software para diversas clases de agua residual

Dentro del procesamiento de imágenes de microscopía y de acuerdo con Young & Gray (1997), se pueden encontrar múltiples formas a identificar según el interés de la técnica, así como diversas estructuras que quizá sean discriminables, tales como elementos no concernientes a los que se va a identificar o cuantificar, pero también elementos borrosos o del fondo del campo visual que añaden complejidad a la interpretación de la imagen. Por lo que es importante resaltar que durante el proceso de desarrollo del sistema automático tales problemáticas se resolvieron con la combinación y adaptación de los algoritmos seleccionados, por ejemplo la eliminación del ruido por medio del algoritmo de Filtrado de Difusión anisotrópica (Perona & Malik, 1990), y la segmentación de los objetos con la ayuda del algoritmo Watershed (Fernández, 2013), lo que permitió obtener porcentajes promedio de 96 y 97% de Sensibilidad y Especificidad, respectivamente, resultados satisfactorios incluso para muestras de agua con alto contenido de detritus.

8.1 Validación internacional

Para realizar la validación internacional del sistema automático se seleccionaron laboratorios en diferentes países, considerando para ello su experiencia en la identificación y cuantificación huevos de helmintos. Los laboratorios de parasitología que participaron en la validación fueron:

- Faculté de Pharmacie de Nancy, Nancy, Francia.
- Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Sao Paulo, Brasil.
- Universidade de São Paulo, Sao Paulo, Brasil.

8.1.1 Validación en la Universidad de Nancy, Francia

Para las pruebas de validación en la Universidad de Nancy, se corrieron un total de 63 imágenes capturadas y procesadas, las cuales contenían las siguientes especies de huevos de helmintos: *Ascaris lumbricoides* (fértil e infértil), *Toxocara canis*, *Trichuris trichiura*, *Uncinarias*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis nana*, *Taenia saginata*, *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepática*.

Después del procesamiento de las imágenes se observó lo siguiente: El sistema identificó correctamente *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia saginata*, y *Fasciola hepatica*; sin embargo, se presentaron problemas para identificar las especies: *Trichuris trichiura*, *Uncinarias* e *Hymenolepis nana*.

Para solventar los problemas detectados, se implementó el uso de una reglilla para determinar la escala real de la imagen (en μm / píxel), observando que los huevos en la validación de imágenes “parecían” de mayor tamaño que los de las imágenes de entrenamiento, lo cual se demostró en la Figura 34, donde los valores de las características de las imágenes tomadas se encuentran desplazados a la derecha.

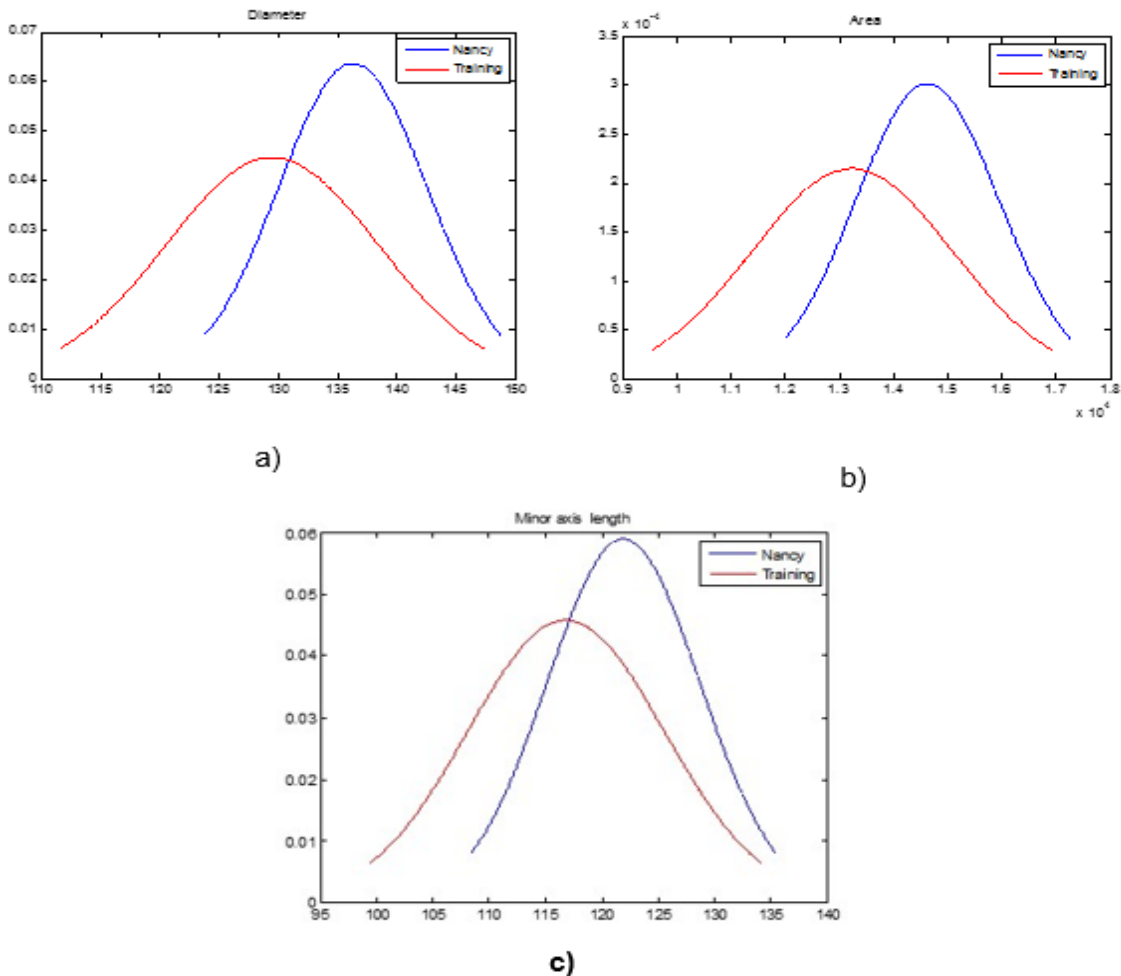


Figura 34. Función de probabilidad de las características de los huevos de *Ascaris lumbricoides* observados en la validación: a) Diámetro, b) Área, c) Eje menor. Línea azul: datos observados, línea roja: datos de entrenamiento

Para el correcto procesamiento de la imagen, se realizó el ajuste de la métrica usado para la detección de diferentes especies de huevos de helmintos y la corrección de las imágenes adquiridas a la misma escala usada en el entrenamiento del sistema.

Las imágenes obtenidas fueron escaladas usando el software matemático Matlab con el nuevo valor al aplicar la reglilla. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas una vez más para la nueva validación. Los resultados indicaron que es estrictamente necesario encontrar el correcto factor de escala E y por lo tanto el tamaño de pixel de la imagen para mantener la sensibilidad y especificidad previamente reportada en los resultados.

Donde:

$$\text{Tamaño del pixel} = \frac{NP}{20 \mu m}$$

Donde NP es la longitud de la división menor (en pixeles) de la reglilla (marcada con rojo en la Figura 35)

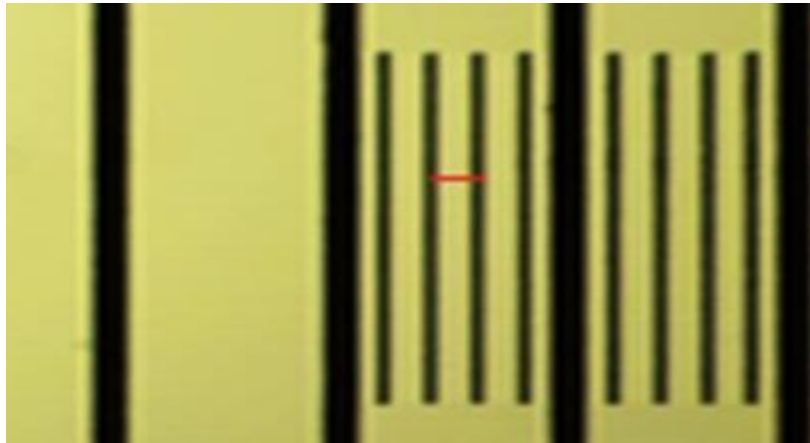


Figura 35. División menor equivalente a $20 \mu m$ marcada con rojo

Para reducir el tamaño de la imagen fue necesario encontrar un método capaz de reducir la dimensión de la imagen pero preservando la forma y textura de las estructuras, esto fue posible empleando una pirámide Gaussiana.

La pirámide Gaussiana consiste en un filtro que reduce la resolución y densidad de la imagen. Una pirámide Gaussiana es una secuencia de imágenes en las cuales cada imagen subsiguiente es el equivalente al filtrado paso-bajo de su predecesor, significando que los valores de 4 pixeles vecinos de la imagen original, que sirve como base de la pirámide, son promediados para formar el valor de un pixel en el siguiente nivel más alto de la pirámide. El nivel inmediato superior de la pirámide tiene la mitad de pixeles que el nivel actual. Siendo así que la pirámide gaussiana contiene promedios locales en diversas escalas. Obteniendo una secuencia de copias de una imagen original en donde la densidad y la resolución son degradadas (disminuidas) a un ritmo constante (Adelson *et al.*, 1984)

Para verificar que las imágenes de los huevos escaladas conservaran características similares a aquellas usadas en el entrenamiento, se compararon parámetros para los huevos de *Ascaris lumbricoides* como: diámetro, área, eje menor y perímetro (Figura 36).

En los gráficos siguientes es posible observar como las características de las imágenes escaladas tienen comportamientos similares a las imágenes de entrenamiento, ya que ambas líneas tienen valores similares por lo que causa su superposición, debido a este escalamiento se corrigió el desplazamiento de los valores hacia la derecha.

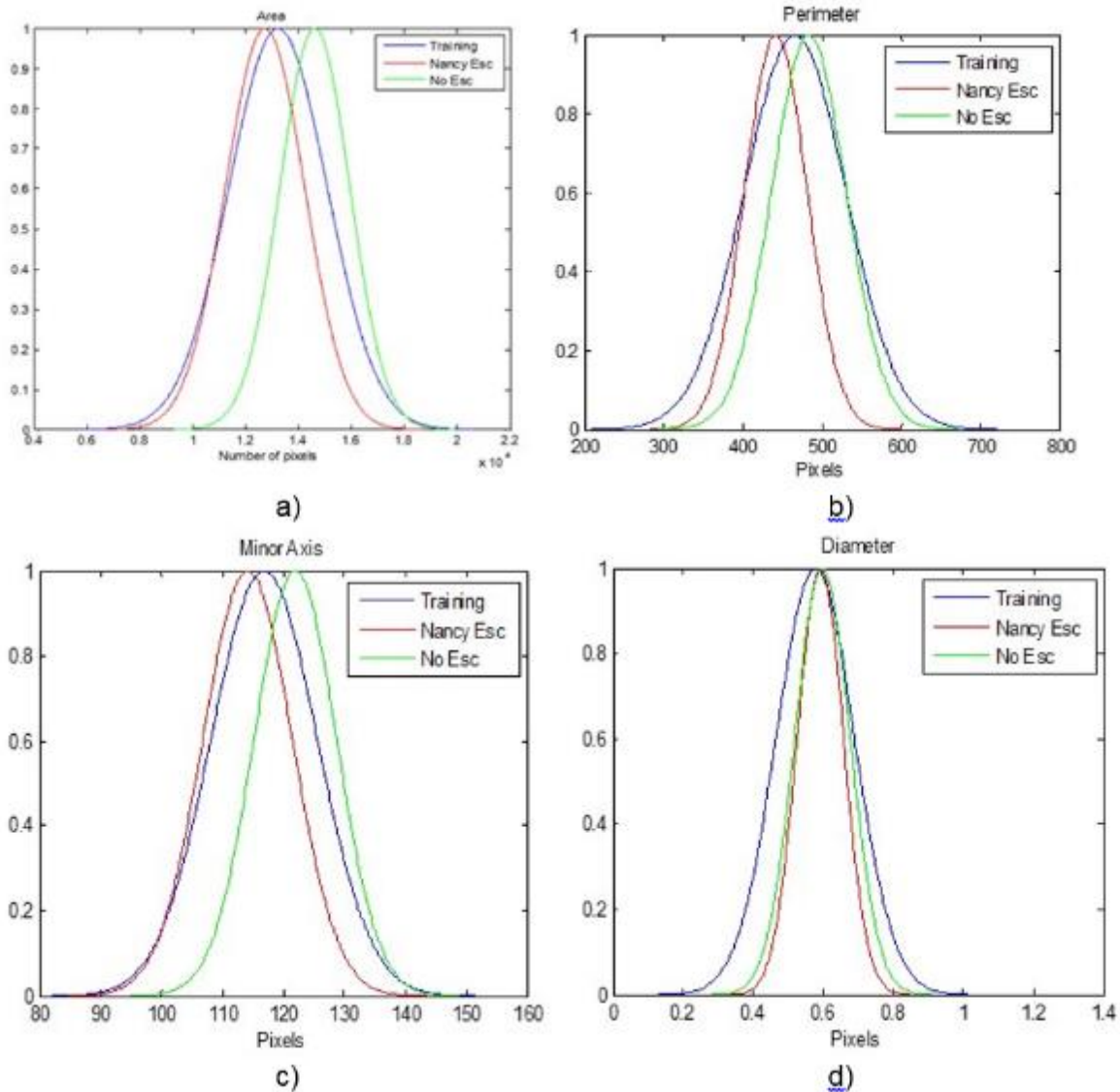


Figura 36 Comparación de características de huevos de *Ascaris lumbricoides*. a) Área, b) Perímetro, c) Eje menor, d) Diámetro. Línea morada: Imágenes de entrenamiento, línea roja: Imágenes Nancy escaladas, línea verde: imágenes Nancy no escaladas

8.1.2 Validación en la Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Posterior a la validación en Francia, se llevaron a cabo las pruebas de validación en el Departamento de Microbiología de la Universidad Pontificia Javeriana en Colombia. 92 imágenes fueron capturadas, las cuales contenían las mismas 10 especies de huevos de helmintos seleccionadas en el estudio y empleadas en Nancy, Francia.

Después del procesamiento de las imágenes obtenidas, se observó que la mayoría de las especies de huevos no eran correctamente identificadas. Se identificó nuevamente que la escala de las imágenes no era la misma que la utilizada en las imágenes de entrenamiento. Por lo cual se aplicó la misma solución antes comentada en la Universidad de Nancy, con la reglilla se obtuvo el factor de escala.

En el caso de muestras de agua residual de la Universidad de Colombia, fue necesario diluir el sedimento de la muestra procesada, ello por la cantidad de detritus sobrepuesto, es importante mencionar que fue el laboratorio de Colombia el que realizó la concentración de sus muestras, por lo que se podría revisar su protocolo de procesamiento y con ello poder reducir la cantidad de detritus final (Figura 37).

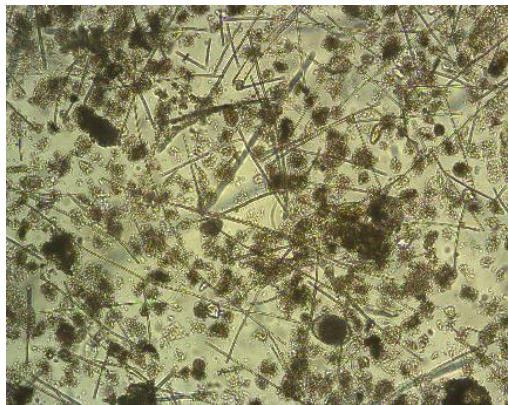


Figura 37. Imagen obtenida en la Pontificia Universidad Javeriana

8.1.3 Validación en Brasil

Dos laboratorios de Brasil, ambos con amplia experiencia en la determinación de huevos de helmintos, fueron elegidos para la validación del Sistema Automático: a) Departamento de Análisis Ambientales de la Compañía Ambiental del Estado de Sao Paulo (CETESB por sus siglas en portugués) y b) Departamento de Salud Ambiental de la Universidad de Sao Paulo (USP).

Más de 350 imágenes fueron empleadas. Se observaron problemas específicos con la identificación de los huevos de la especie *Hymenolepis nana*. Comparando los valores de la media para las características de nivel de gris para el caso particular de los huevos de *Hymenolepis nana*, se observó que los valores de las imágenes de la validación fueron mayores que los obtenidos en el entrenamiento. Los altos valores para la relación Objeto/Fondo que el huevo de *Hymenolepis nana* presenta en la validación indica que éste es casi transparente, lo que conllevó a que el sistema no

podiera identificarlo, como se puede observar en la Figura 38. En el caso del resto de las especies no se presentó ningún problema de identificación.



Figura 38. Huevo de *Hymenolepis nana*

Por lo tanto, los huevos de *Hymenolepis nana* se dividieron en dos tipos, uno considerando todas las características de forma, nivel de grises y textura, y el segundo no considerando las características de nivel de grises. Después la corrección, el sistema fue capaz de validar este caso particular de huevos. La Figura 39 muestra un ejemplo de la efectividad de los ajustes realizados.

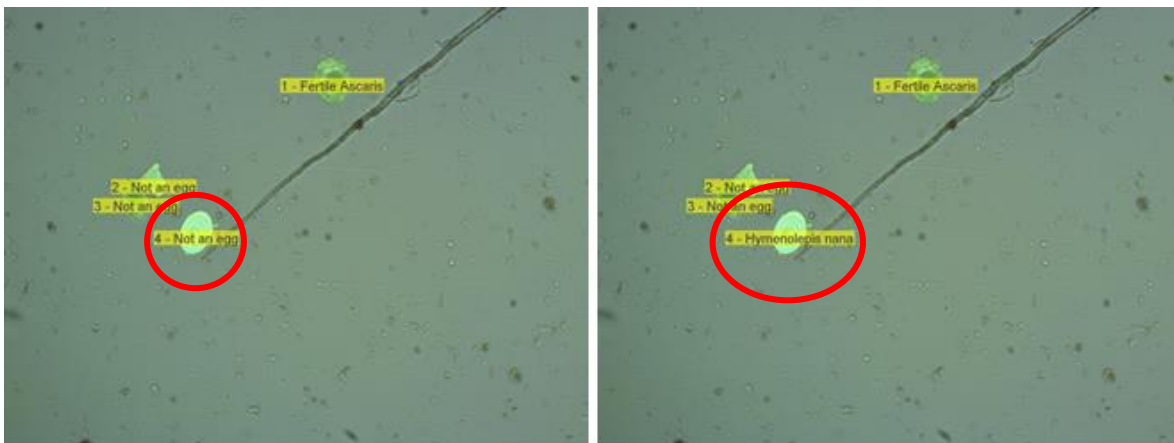


Figura 39. Identificación de un huevo de *Hymenolepis nana*: antes de los ajustes de nivel de gris (izquierda), después de los ajustes (derecha)

Patentes: El Sistema Automático desarrollado ya se ha registrado y se encuentra en proceso de patente, tanto, en Estados Unidos (Number application 14879466, United States of America), como en México (Aplicación MX/A/2015/015024, México, 2015).

9. CONCLUSIONES

El Sistema Automático desarrollado para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de diferentes calidades de agua residual representa una propuesta alternativa real y confiable, en comparación con la etapa de la lectura directa al microscopio de la técnica tradicional, para los operadores de plantas de tratamiento que constantemente monitorean la calidad del efluente, así como en diversas comunidades, y con ello reducir o eliminar los riesgos a la salud que este tipo de parásitos ocasiona.

La principal ventaja del sistema automático vs la técnica tradicional es que al no requerir de personal especializado los resultados son confiables, ya que no dependen de la subjetividad del técnico analista capacitado (cuando lo está), quien al efectuar una lectura de una muestra que contiene un alto contenido de detritus, con tiempos de observación directa al microscopio óptico que pueden llegar a superar las 2 horas, y , donde la discriminación de los huevos se vuelve tediosa generando sub o sobre conteos. Su uso permitirá, también, reducir costos, al no requerir de un analista experto, y reducir los tiempos en la identificación y cuantificación que la técnica tradicional involucra.

Es de recalcar que la utilidad y efectividad del Sistema Automático desarrollado es aplicable para el análisis de muestras de diferentes calidades de agua residual, además de serlo también para muestras clínicas o de estructuras aisladas de un Atlas, como se hizo en el caso de los sistemas automáticos anteriores.

La base de las imágenes originales adquiridas permitió identificar correctamente las características clave de las diferentes especies de huevos de helmintos (como por ejemplo, forma, textura, etc.). Así mismo la secuencia de los algoritmos de procesamiento de imágenes empleados permitió llevar a cabo la cuantificación e identificación de 10 diferentes especies de huevos de helmintos, seleccionadas por su importancia médica y distribución a nivel mundial.

La Evaluación realizada con tres diferentes clases de agua residual muestran los siguientes porcentajes de Sensibilidad y Especificidad

Tipo de muestra	Concentración de ST (mg/L)	% Sensibilidad	% Especificidad
Clase I	<15	100	100
Clase II	>15 - <150	98	99
Clase III	> 150	93	89
	Promedio	97	96

La validación internacional permitió implementar mejoras en la aplicación del escalamiento de imágenes con una reglilla de referencia para ajustar los parámetros de los objetos y con ello el desempeño del Sistema Automático.

El Sistema Automático para la identificación de huevos de helmintos en agua residual desarrollado constituye una herramienta robusta, lo que implica que cuenta con el posible potencial de incluir más especies de helmintos o incluso de otro tipo de parásitos de interés médico.

10. RECOMENDACIONES

Para lograr obtener porcentajes mayores de Sensibilidad y Especificidad en muestras con alto contenido de sólidos (Clase III) y con ello eliminar la sobreposición de estructuras, se recomienda llevar a cabo la dilución del sedimento final de la muestra procesada.

De igual manera, mejoras y ajustes a futuro del algoritmo de segmentación de los objetos podrían permitir un reconocimiento mayor de huevos de helmintos cuando existe una carga importante de detritus.

Y continuar con las mejoras del Sistema Automático para su aplicación a otro tipo de matrices ambientales tales como lodos, biosólidos, suelos y excretas.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Ingeniería, UNAM, por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo de tesis, así como a la Fundación Bill y Melinda Gates (Grant ID# OPP1094904), por el apoyo económico recibido para la realización del presente trabajo de tesis.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adelson, E.; Anderson, C.H.; Bergen, J.R.; Burt, P.J; Ogden, J.M. (1984) Pyramid Methods in Image Processing. *RCA Engineer*, **29**(6), 33-41.
- Álvarez, T., Matín, Y., Pérez, S., Santos, F., Tadeo, F., González, S., Vega, P. (2001). Classification of Microorganisms Using Image Processing Techniques . *IEEE*, 329-332.
- APHA, AWWA, & WPCF. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D.C: American Public Health Association.
- Arámbula, F., Márquez, J., Padilla, M., Solano, S., & Tato, P. (2005). Automatic analysis of immunocytochemically stained tissue samples. *Medical & Biological Engineering & Computing*, **43**(5), 672-677.
- Aristondo, J. (2010). Tesis de Maestría: Algoritmo de reconocimiento de forma y color para una plataforma robótica. *Universidad del País Vasco*. España.
- Avci, D., & Varol, A. (2009). An expert diagnosis system for classification of human parasite eggs based on multi-class SVM. *Expert Systems with Applications*, **36**, 43-48.
- Ayres, R., Alabaster, G., Mara, D., & Lee, D. (1992). A Design equation for human intestinal nematode egg removal in waste stabilization ponds. *Water Research*, **26**(6), 863-886.
- Biagi, F. (2004). *Enfermedades Parasitarias* (3ª ed.) Editorial El Manual Moderno. México.
- Bitton, G. (1995). Wastewater microbiology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **64**(2), 213-214.
- Botero, D. (1981). Persistencia de parasitosis intestinales endémicas en América Latina. *Bol Of Sanzt Panam*, **90**(1), 39-47.
- Brusca, C., & Brusca, J. (2003). *Invertebrados* (2ª ed.). Mc. Graw-Hill Interamericana. España.
- Caballero, M. L. (1998). Inmunología de la infección por helmintos. *Revista Española Alergología e Inmunología Clínica*, **13**(6), 297-313.
- Calvo, C., & Durán, L. (1997). *Propiedades físicas II. Óptica y color*. En: Aguilera, J.M. (Ed.). Temas en Tecnología de alimentos. Instituto Politécnico Nacional. México (261-288 pp.).
- Carcedo y Franco, A. (2004). Tesis: Programa de segmentación de regiones en imágenes médicas en MATLAB. Universidad de las Américas Puebla. México.
- Castañón, C., Fraga, J., Fernández, S., Gruber, A., & Costa, L. (2006). Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus Eimeria. *Pattern Recognition*, **40**, 189-191.
- China, L. (2016). Tesis de Mestría: Algoritmos y programas de procesamiento digital e imágenes para el diagnóstico de la malaria en análisis de laboratorio. *Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas*. Cuba.

- Ciesielski, V., & Spicer, J. (1994). Embedding neural nets and expert systems in diagnostic microbiology laboratories. *Royal Melbourne Institute of Technology*, 42-46.
- Coto, E. (2003). Métodos de Segmentación de Imágenes Médicas. *Lecturas en Ciencias de la Computación*, 5, 4-17.
- Danckaert, A., Gonzalez-Couto, E., Bollondi, L., Thompson, N., & Hayes, B. (2002). Automated Recognition of Intracellular Organelles in Confocal Microscope Images. *Traffic*, 3, 66-73.
- Dogantekin, E., Yilmaz, M., Dogantekin, A., Avci, E., & Sengur, A. (2008). A robust technique based on invariant moments- ANFIS for recognition of human parasite eggs in microscopic images. *Expert Systems with Applications*, 35, 728-738.
- Duda, R., Hart, P., & Stork, D. (1973). *Pattern Classification* (2nd ed.). Wiley-Interscience. USA.
- Ellis, K., Rodríguez, P., & Gómez, C. (1993). Parasite ova and cysts in waste stabilization ponds. *Water research*, 27, 1455-1460.
- Feachmen, R., Bradley, D., Garelick, H., & Mara, D. (1983). *Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*. The International Bank for Reconstruction and Development. USA.
- Fernández, C. (2013). *Desarrollo de métodos de procesamiento de imágenes laríngeas en color para la detección del espacio glotal y de las cuerdas vocales*. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Fernández, M., & Rivas, G. (2007). Niveles de organización en animales. *Las prensas de ciencias*, 92-114.
- Gallego, B. (2007). *Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario* (2^{da} ed.). Ediciones Universidad Barcelona. España.
- García, M. (2012). *Microbiología y Parasitología* (2^{da} Ed). UNPA. Obtenido de: <http://grupoenfermeriaunpa.blogspot.mx/2012/06/schistosoma-mansoni.html>
- García-Olalla, O., & Alegre, E. (2013). *Descripción de textura en imágenes utilizando Local Binary Pattern (LBP). Conceptos y métodos en Visión por Computador*. Universidad de León, España.
- Gaspard, G., Wiart, J., & Schwartzbrod, J. (1994). Etude experimentale de l'adhesion des oeufs d'helminthes (Ascaris suum) consequences pour l'environnement. *Revue des Sciences de l'Eau*, 4, 367-376.
- Gonzalez, R., & Woods, R. (1993). *Digital Image Processing* (3rd ed.). Pearson Education. USA.
- Guo, Z., Zhang, L., & Zhang, D. (2010). Rotation invariant texture classification using LBP variance (LBPV) with global matching. *Pattern Recognition*, 43, 706-719.
- Jimenez, B., & Maya, C. (2007). Helminths and Sanitation. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (60-71 pp.). FORMATEX. Spain.

- Jiménez, B., & Wang, L. (2006). Chapter 12. Sludge treatment and management. En Z. Ujang, & M. Henze (Edits.), *Municipal wastewater management in developing countries*. IWAP. London.
- Jiménez, B., Maya, C., & Salgado, G. (2001). The Elimination of helminth ova, faecal soliforms, Salmonella and protozoan cysts by various physicochemical processes in wastewater and sludge. *Water Science & Technology*, **43**(12), 179-182.
- Jiménez, B., Maya, C., Velásquez, G., Torner, F., Arambula, F., Barrios, J., & Velasco, M. (2016). Identification and quantification of pathogenic helminth eggs using a digital image system. *Experimental Parasitology*, **166**, 164-172.
- Kreitz, S., Hess, A., & Anderson, T. (1995). Direct enumeration and size classification of soil bacteria using confocal laser scanning microscopy and image analysis. *IEE*, 454-457.
- Lamothe, & García. (1988). *Helmintiasis del hombre en México*. México: AGT Editor, S.A.
- Lira, J. (2010). *Tratamiento digital de imágenes multispectrales* (2^{da} ed.). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- NMX-AA-113-SCFI. (1999). *Análisi de agua-Determinación de huevos de helminto-Método de Prueba*.
- Metcalf & Eddy, Inc (1991) *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse*. (3rd ed.) McGraw-Hill, New York, USA.
- NOM-003-SEMARNAT. (1997). *Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales*.
- Perona, P., & Malik, J. (1990). Scale-Space and Edge Detection Using Anisotropic Diffusion. *IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE*, **12**(7), 629-639.
- Platero, C. (2005). Análisis de imágenes biomédicas en color procedentes de microscopía en campo claro. *Simposio de Ingeniería de Sistemas y Automática en Bioingeniería SISAB 2005*. Granada, España.
- Prados, M. B. (2006). Tesis Doctoral: Desarrollo de Modelos para la Segmentación Difusa de Imágenes en Color. *Universidad de Granada*. España.
- Pullan, R., Smith, J., Jasrasaria, R., & Booker, S. (2014). Global numbers of infection an disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*, **7**(37).
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J., & Piédrola-Angulo, G. (1992). *Microbiología y Parasitología Médica* (2da ed.). MASSON. España.
- Ranefall, P., Wester, K., & Bengtsson, E. (1998). Automatic quantification of immunohistochemically stained cell nuclei using unsupervised image analysis. *Anal. Cel. Path.*, **16**, 29-43.
- Ranganna, S. (1986). Color measurement. En *Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products* (2nd ed.). India: Mc Graw-Hill.

- Rojas, N., Orta, T., Vaca, M., & Franco, V. (2003). Generation of by products resulting form ozone application on intestinal parasites in wastewater. *XXX International Association for Hydraulic Research Congress. Theme B*, 549-556. Tesalónica, Grecia.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (3ra ed.). Editorial Médica Panamericana. México.
- Ruru, P., Weidong, G., & Jihong, L. (2009). Color Clustering Analysis of Yarn-dyed Fabric in HSL Color Space. *World Congress on Software Engineering*, (273-278 pp.).
- Saredi, G. (2002). Manual práctico de parasitología médica. *Laboratorios Andrómaco*. Argentina.
- Sauvola, J., & Pietikäinen, M. (2000). Adaptive document image binarization. *Pattern Recognition*, **33**, 225-236.
- Smit, J., & Nasr, J. (1992). Urban agriculture for sustainable cities:using wastes and idle land and water bodies as resources. *Environment and Urbanization*, **4**(2), 141-152.
- Stephenson, L., Holland, C., & Cooper, E. (2000). The public health significance of *Trichuris trichiura*. *Parasitology*, **121**, S73-S95.
- Strauss, M., Drescher, S., Zurbrügg, C., & Montangero, A. (2003). *Co-composting of fecal sludge and municipal orgaic waste. A Literatire and State-of-Knowledge Review*. Swiss Federal Institute of Environmental Science and Technology (EAWAG) and IMWI. Ghana.
- Strunz, E, Addiss, D., Stocks, M., Ogden, S., Utzinger, J., Freeman, M. (2014). Water, Sanitation, Hygiene, and Soil-Transmitted Helminth Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Medicine*, **11**(3).
- Tay, J., & Trinidad, J. (2002). Características de protozoarios y helmintos capaces de causar diarrea aguda en humanos. *Revista de la Facultad de Medicina*(2) 64-70.
- Tay, J., Gutiérrez, M., Lara, R., & Velasco, O. (2010). *Parasitología Médica de Tay* (8 ed.). Méndez Editores. México
- Trönberg, L., Hawksworth, D., Hansen, A., Archer, C., & Stremström, T. (2010). Household-based prevalence of helminth and parasitic protozoa in rural KwaZulu-Natal, South Africa, assessed from faecal vault sampling. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**, 642-652.
- Uribarren, T. (2016). *Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/ascariosis.html>
- Wahl, F. (1983). A New Distance Mapping and its Use for Shape Measurement on Binary Patterns. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, **23**, 218-226.
- WHO (1989). *Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture: report of a WHO scientific group*. Geneva: WHO.
- WHO (2006). *WHO Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater* (Vol. II: Wastewater Use in Agriculture). WHO.

- WHO (2012). Soil-Transmitted Helminthiases. Eliminating Soil-Transmitted helminthiases as a public health problem in children. (WHO, Ed.) *Progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020*.
- WHO (2016). *Soil-transmitted helminth infections*. *WHO Fact Sheets*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/en/>
- WHO (2017). *Esquistosomiasis*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>
- Yang, Y., Park, D., Kim, H., Choi, M., & Chai, J. (2001). Automatic identification of human helminth eggs on microscopic fecal specimens using digital image processing and an artificial neural network. *IEEE Transactions on Biomedicine*, **48**(6), 718-730.
- Young, D., & Gray, A. (1997). Semi-Automatic boundary detection for identification of cells in DIC microscope images. *IEE IPA97 Conference publication*, 718-730.
- Young, D., Glasbey, C., Gray, A., & Martin, N. (1995). Identification and sizing of cells in microscope images by template matching and edge detection. *IEE Image Processing and Its Applications. Conference publication*, **410**, 266-270.

ANEXO 1- NMX-AA-113-SEMARNAT-1999



NMX-AA-113-SCFI-1999

P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ASOCIACIÓN NACIONAL DE LA INDUSTRIA QUÍMICA, A.C.
Dirección General.
- ASOCIACIÓN NACIONAL DE PRODUCTORES DE REFRESCOS Y AGUAS CARBONATADAS
Dirección Técnica.
- CÁMARA DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN DE NUEVO LEÓN
Instituto para la Protección Ambiental - Dirección General.
- CÁMARA MINERA DE MÉXICO
Comisión de Ecología y Recursos Naturales.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE ACEITES, GRASAS Y JABONES
Gerencia de Ecología, Normas y Salud.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DEL HIERRO Y DEL ACERO
Instituto Mexicano del Hierro y el Acero.
- CÁMARA NACIONAL DEL CEMENTO
- COLEGIO DE INGENIEROS MECÁNICOS Y ELECTRICISTAS
Coordinación del Comité Nacional Permanente de Peritos de Riesgo Ambiental.
- COMISIÓN FEDERAL DE ELECTRICIDAD
Gerencia de Protección Ambiental.
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE
- CONFEDERACIÓN DE CÁMARAS INDUSTRIALES
Comisión de Ecología.



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-AA-113-SCFI-1999

- CONFEDERACIÓN PATRONAL DE LA REPÚBLICA MEXICANA
Comisión Nacional de Ecología.
- DEPARTAMENTO DEL DISTRITO FEDERAL
Subdirección de Verificación y Control de la Contaminación.
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Academia de Ingeniería Sanitaria;
Centro de Investigación y Estudios Avanzados.
- INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
Dirección General.
- PETRÓLEOS MEXICANOS
Exploración y Producción-Subgerencia de Normatividad y Promoción;
Refinación-Gerencia de Protección Ambiental y Seguridad Industrial;
Dirección de Gas y Petroquímica Básica;
Dirección Corporativa de Administración.
- PROCURADURÍA FEDERAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE
Dirección General de Verificación al Ordenamiento Ecológico.
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de Agricultura.
- SECRETARÍA DE COMUNICACIONES Y TRANSPORTES
Dirección General de Transporte Terrestre Federal.
- SECRETARÍA DE ECOLOGÍA DEL ESTADO DE MÉXICO
Dirección General de Normatividad y Apoyo Técnico.
- SECRETARÍA DE ENERGÍA
Dirección de Seguridad y Protección al Ambiente.
- SECRETARÍA DE GOBERNACIÓN
Dirección General de Protección Civil.
- SECRETARÍA DE MARINA
Dirección de Protección al Medio Ambiente.
- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA
Subsecretaría de Recursos Naturales.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- SECRETARÍA DE SALUD
Dirección General de Salud Ambiental.
- SECRETARÍA DEL TRABAJO Y PREVISIÓN SOCIAL
Subdirección de la Unidad de Estructuración de Normas.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Coordinación de Investigación.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Centro de Ciencias de la Atmósfera;
Coordinación de Investigación Científica;
Facultad de Ingeniería-Laboratorio de Control de Emisiones.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número de capítulo		Página
0	Introducción	1
1	Objetivo y campo de aplicación	1
2	Referencias	2
3	Definiciones	2
4	Principio	3
5	Muestreo	4
6	Reactivos y materiales	4
7	Aparatos	5
8	Preparación y acondicionamiento de la muestra	5
9	Procedimiento	5
10	Expresión de resultados	9
11	Informe de la prueba	11
12	Bibliografía	11
13	Concordancia con normas internacionales	12

NMX-AA-113-SCFI-1999**ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE
HELMINTO - MÉTODO DE PRUEBA****ANALYSIS OF WATER - DETERMINATION OF HELMINTH EGGS
- TEST METHOD****O INTRODUCCIÓN**

Ante la escasez de recursos hídricos, la explosión demográfica y el desarrollo industrial, la utilización de aguas residuales es una importante alternativa como fuente adicional de suministro, particularmente para riego agrícola. Sin embargo, dicha actividad tiene implicaciones negativas desde el punto de vista sanitario, ya que representa un riesgo a la salud de los trabajadores agrícolas y de los consumidores de los productos, en especial cuando se trata de aquéllos que se consumen crudos como las hortalizas.

Los helmintos representan un elevado riesgo a la salud humana debido a que sus diversos estadios infecciosos (huevos embrionados o larvas) son altamente persistentes en el agua contaminada. Así, el agua constituye un vehículo directo o indirecto de diseminación de helmintos, aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, dando lugar a enfermedades gastrointestinales, sobre todo cuando ésta se emplea para el riego de cultivos.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la detección y enumeración de huevos de helminto en aguas residuales y lodos, con el fin de evaluar la calidad del agua y la eficiencia de los sistemas de tratamiento de la misma.

Esta norma mexicana es aplicable para la evaluación de la calidad del agua residual cruda y tratada.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-AA-113-SCFI-1999
2/12

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas y normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

- | | |
|-------------------|---|
| NOM-001-ECOL-1996 | Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997. |
| NOM-003-ECOL-1997 | Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de septiembre de 1998. |
| NMX-AA-003-1980 | Aguas residuales - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980. |
| NMX-BB-014-1973 | Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorio. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de agosto de 1973. |
| NMX-CC-013-1992 | Criterios generales para la operación de los laboratorios de pruebas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de junio de 1992. |

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Aguas residuales

Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas.

3.2 Coagulación

Es la adición de compuestos químicos para alterar el estado físico de los sólidos coloidales o suspendidos, a fin de facilitar su remoción por sedimentación o filtración.

3.3 Filtración

Es la remoción de las partículas suspendidas de un líquido que fluye a través de un medio de porosidad adecuada.

3.4 Flotación

Es la técnica de concentración donde las partículas de interés permanecen en la superficie de la solución cuya densidad es mayor. Por ejemplo, la densidad de huevos de helminto se encuentra entre 1,05 y 1,18, y la de los líquidos de flotación se sitúa entre 1,1 y 1,4.

3.5 Helmintos

Término designado a un amplio grupo de organismos que incluye a todos los gusanos parásitos (de humanos, animales y vegetales) y de vida libre, con forma y tamaños variados. Poseen órganos diferenciados, y sus ciclos de vida comprenden la producción de huevos o larvas, infecciosas o no y la alternancia compleja de generaciones que incluye hasta tres huéspedes diferentes.

3.6 Método bifásico

Es la técnica de concentración que utiliza la combinación de dos reactivos no miscibles entre sí, y donde las partículas (huevos y detritus) se orientan en función de su balance hidrofílico-lipofílico.

3.7 Sedimentación

Es el proceso físico de separación entre dos fases debido a la diferencia de sus densidades.

4 PRINCIPIO

Este método de análisis se basa en la diferencia de densidades entre los huevos de helminto, las demás sustancias presentes en las aguas residuales, y las que se agregan para permitir la separación. El método comprende los procesos de coagulación, sedimentación, flotación, decantación y la técnica bifásica para recuperar los huevos de helminto y efectuar el conteo.

5 MUESTREO

El muestreo constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de la calidad del agua, por lo cual, éste debe efectuarse como se menciona a continuación y de acuerdo a lo establecido en las normas mexicanas NMX-AA-003 y NMX-BB-014 (ver 2 Referencias):

- 5.1 Preparar garrafones de plástico inerte de 8 L, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 10 % (NaClO).
- 5.2 Lavarlos con agua potable a chorro y enjuagarlos varias veces con agua destilada.
- 5.3 Se toman muestras de 5 L (volumen total), en estos garrafones de plástico inerte, los cuales deben ser cerrados y sellados.

6 REACTIVOS Y MATERIALES

6.1 Reactivos (grado analítico)

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- Alcohol etílico (C_2H_5OH);
- Agua destilada;
- Cloruro de sodio (NaCl);
- Éter etílico;
- Formaldehído al 4 %;
- Hipoclorito de sodio (NaClO) (no aplica grado analítico), y
- Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

6.2 Materiales

- Aplicadores de madera;
- Barras magnéticas;
- Bulbo de goma;
- Espátula;
- Garrafones de plástico inerte con paredes lisas y transparentes de 8 L de capacidad;
- Gradillas para tubos de centrifuga de 50 ml;
- Guantes de látex;
- Mascarilla contra gases y vapores;
- Matraz Kitazato;
- Pipetas de 10 ml de plástico;
- Probetas graduadas de 50 ml y de 1 000 ml;
- Recipientes de plástico inerte con paredes lisas y transparentes de 2 000 ml y 4 000 ml de capacidad;



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-AA-113-SCFI-1999

5/12

- Tamiz de 160 μm (micras) de poro;
- Tubos de centrifuga de 200 ml, 450 ml o de mayor volumen según sea la capacidad máxima de la centrifuga;
- Tubos de centrifuga cónicos de 50 ml, y
- Vasos de precipitados de 1 000 ml.

NOTA- Los materiales utilizados deben cumplir con lo establecido en la norma mexicana NMX-BB-014 (ver 2 Referencias).

7 APARATOS

- Agitador de tubos, con control de velocidad y adaptable a diversos tubos;
- Balanza granataria;
- Balanza analítica;
- Bomba de vacío con control de velocidad de succión;
- Campana de extracción;
- Celda de Sedgwich-Rafter o cámara de conteo de Doncaster o cámara de Neubauer;
- Centrifuga. Capaz de mantener los intervalos de operación de 1 000 r/min a 3 000 r/min o su equivalente en **g**;
- Densímetro (Hidrómetro). Capaz de mantener el intervalo de medición de 1,0 g/ml a 1,4 g/ml, y temperatura de operación de 0°C a 4°C;
- Incubadora;
- Microscopio óptico. Equipado para hacer iluminación campo claro (Köheler), con aumento de 10 a 100x y platina móvil (opcional);
- Parrilla con agitación magnética, y
- Refrigerador.

8 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

- 8.1 Las muestras deben mantenerse a una temperatura de 4°C \pm 2°C hasta su llegada al laboratorio.
- 8.2 La muestra debe procesarse dentro de las 48 h después de su toma, o en caso contrario, debe fijarse con 10 ml de formaldehído al 4 %, o bien, preservarse en refrigeración para realizar su análisis antes de 2 meses.

9 PROCEDIMIENTO

Los siguientes puntos describen la secuencia del método de prueba, el cual debe realizarse conforme a lo descrito, con el fin de minimizar sesgos en los datos obtenidos.

9.1 Preparación de soluciones

9.1.1 Solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) con gravedad específica de 1,3

Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) en 1 000 ml de agua destilada; mezclar en la parrilla magnética hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con el densímetro. Ajustar la densidad a 1,3 agregando sulfato de zinc o agua destilada, según sea el caso.

9.1.2 Solución de alcohol-ácido.

Homogeneizar 650 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N, con 350 ml de alcohol etílico. Almacenar la solución en un recipiente hermético.

9.2 Calibración de aparatos

Todos los equipos utilizados deben ser calibrados con patrones certificados o ajustados de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

9.3 Seguridad

Durante el procesado de la muestra se debe utilizar guantes de látex y cubreboca para evitar cualquier riesgo de infección.

Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo.

Cuando se efectúe la agitación de las soluciones con éter, ésta se debe realizar en sitios ventilados o dentro de la campana de extracción, y considerar su inflamabilidad. Evitar el contacto con los ojos, piel o ropa, ya que es un reactivo sumamente tóxico.

9.4 Manejo de residuos

Todo material desechado debe ser previamente esterilizado o desinfectado con hipoclorito de sodio al 10%.

9.5 Concentración y separación de los huevos de helminto

La recuperación de los huevos de helminto de la muestra se debe realizar efectuando los siguientes pasos:

- a) Dejar reposar la muestra al menos 3 h o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- b) Aspirar y desechar el sobrenadante por vacío y sin agitar, si la sedimentación (separación) se realizó por centrifugación, decantar lentamente. Filtrar el sedimento en el tamiz de 160 μm de poro. Lavar el tamiz con 5 L de agua (potable o destilada), y recuperar el agua de lavado junto con el sedimento filtrado.
- c) Colocar el filtrado y el agua de enjuague en el garrafón de 8 L donde originalmente se encontraba la muestra o en los recipientes utilizados en la centrifugación.
- d) Dejar reposar la muestra al menos 3 h o toda la noche o centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- e) Aspirar con cuidado el sobrenadante al máximo y desecharlo. Depositar el sedimento en los recipientes para la centrifuga. Enjuagar 3 veces el garrafón perfectamente con poca agua destilada, y colocar en los recipientes para centrifugación.
- f) Centrifugar a 400 **g** de 3 min a 5 min.
- g) Decantar nuevamente el sobrenadante por vacío. Asegurarse que en el fondo del recipiente exista la pastilla; en caso contrario, centrifugar nuevamente. Resuspender la pastilla en 150 ml de la solución de sulfato de zinc (ZnSO_4). Homogeneizar la pastilla con el agitador de tubos o con un aplicador de madera.

- h) Una vez más, centrifugar a 400 g de 3 min a 5 min, y recuperar el sobrenadante virtiéndolo en un recipiente de plástico de 2 000 ml. Diluir cuando menos en 1 000 ml de agua destilada, y dejar sedimentar al menos 3 h, o toda la noche o centrifugar a 400 g de 3 min a 5 min.
 - i) Aspirar con cuidado y al máximo el sobrenadante por vacío, y resuspender el sedimento por agitación, utilizando poca agua destilada. Vertir la suspensión resultante en un tubo de centrifuga de 200 ml, incluyendo el agua de enjuague del recipiente y centrifugar a 480 g durante 3 min.
 - j) Decantar nuevamente el sobrenadante y resuspender la pastilla con agua destilada en un tubo de 50 ml y centrifugar a 480 g durante 3 min.
 - k) Decantar nuevamente el sobrenadante por vacío y resuspender la pastilla en 15 ml de la solución de alcohol-ácido por medio de un agitador de tubos, y agregar 10 ml de éter. Agitar suavemente y de vez en cuando destapar cuidadosamente los tubos para dejar escapar el gas que se desprenda. Por seguridad realizar en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción
 - l) Centrifugar una última vez a 660 g durante 3 min.
 - m) Aspirar al máximo el sobrenadante, dejando menos de 1 ml del mismo y evitando la pérdida de la pastilla; homogeneizar la pastilla, y proceder a la cuantificación. Por seguridad realizar en sitios ventilados utilizando la mascarilla o en la campana de extracción.
- 9.6 Cuantificación de los huevos de helminto
- a) Para evitar la sobreposición de las estructuras y el detritus no eliminado, repartir la muestra en volúmenes de 0,5 ml a 1,0 ml, con el fin de facilitar la lectura.
 - b) Distribuir cada uno en una celda de Sedgwich-Rafter, o bien, en una cámara de conteo de Doncaster o cámara Neubauer.

- c) Identificar visualmente una a una las estructuras, anotando los generos identificadas con ayuda de la figura 1.

10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

10.1 Cálculos

Para determinar las revoluciones por minuto (rev/min) de la centrifuga, se utiliza la fórmula siguiente:

$$\text{rev/min} = \sqrt{Kg/r}$$

donde:

- g** es la fuerza relativa de la centrifugación;
K es la constante cuyo valor es 89,456, y
r es el radio de la centrifuga en centímetros (cm).

La fórmula para calcular **g** es la siguiente:

$$g = r(\text{rev/min})/K$$

- 10.2 Expresar el resultado en número de huevecillos por litro, tomando en consideración la expresión en cálculos, o bien expresar el número de huevos contados y el volumen analizado:

$$HL = \frac{H}{5}$$

donde:

- H** es el número de huevos leídos en la muestra;
HL es el número de huevos por litro, y
5 es el volumen de la muestra.

10.2 Interferencias

La sobreposición de estructuras y/o detritus no eliminado en el sedimento, puede dificultar su lectura. En tal caso, es importante dividir el volumen en las alícuotas que se consideren necesarias. La falta de experiencia en la identificación de especies es también un elemento decisivo en el conteo y sobreconteo.

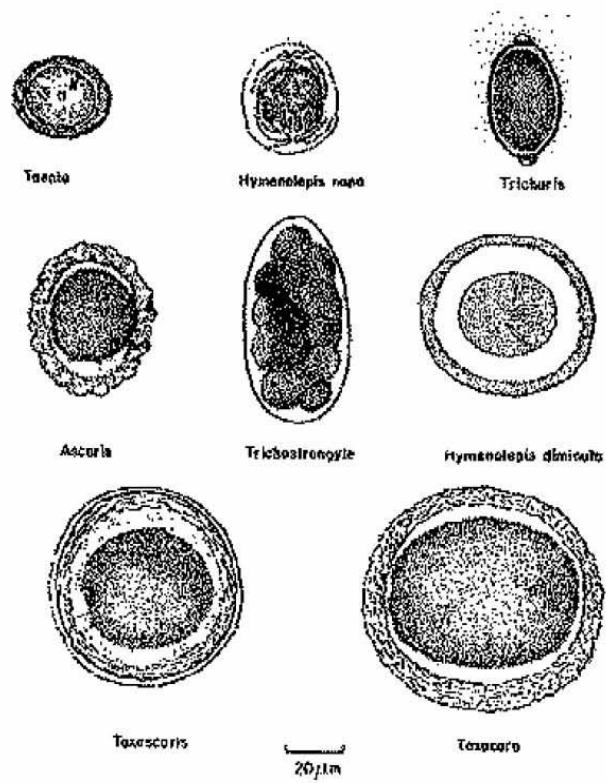


FIGURA 1.- Especies de huevos de helminto

11 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba debe incluir lo siguiente:

- Todos los detalles necesarios para la identificación completa de la muestra;
- Los resultados, expresados de acuerdo con lo establecido en el punto 10, y
- Cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis, así como cualquier operación no especificada en el método, o considerada opcional, que pueda haber influido en los resultados.

12 BIBLIOGRAFÍA

- 12.1 NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.
- 12.2 Ayres, R. M., *A Practical Guide for the Enumeration of Intestinal Helminths in Raw Wastewater and Effluent from Waste Stabilization Ponds*. (Guía práctica para la enumeración de helmintos intestinales en aguas residuales y efluentes provenientes de estanques residuales de estabilización). Leeds University Department of Civil Engineering. 1989, 19 pp.
- 12.3 CETESB, São Paulo, *Helminhos e Protozoários Patogênicos Contagem de Ovos e Cistos em Amostras Ambientais* (Helmintos y protozoarios patógenos presentes en huevos y quistes en muestras ambientales). 1989, 33 pp.
- 12.4 Cifuentes, E., U. Blumenthal, P. G. Ruiz y S. Bennett. Health Impact Evaluation of Wastewater Use in Mexico. (Evaluación del impacto en la salud de las aguas residuales utilizadas en México) *Public Health Rev.* 1991/92 19:243-250.
- 12.5 De León, R., P. Ch. Gerba y B. J. Rose, *Manual de Vigilancia de Parásitos en el Agua*. Universidad de Arizona EEUU. 1988, 48 pp.
- 12.6 Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE), *Diagnóstico Parasitológico*. 1993, Capítulo IV-6, 1-43 p.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-AA-113-SCFI-1999
12/12

- 12.7 Jiménez, B. y C. Maya, *Evaluación de las diversas técnicas para la detección de los huevos de helminto, y selección de una para conformar la NMX correspondiente*. Instituto de Ingeniería, UNAM, México, 1996.
- 12.8 Lamothe, R. y P. L. García, *Helmintos del Hombre en México-Tratamiento y Profilaxis*. Edit. AGT, 1988, 25-98 pp.
- 12.9 Martínez, B. M., *Manual de Parasitología Médica*. Edit. La Prensa Médica Mexicana, 1986, 183-316 p.
- 12.10 Organización Mundial de la Salud, *Guías para la calidad del agua potable*. 1995, Vol. 1, 2a. Edic., España.
- 12.11 Satchwell, G. M., An Adaptation of Concentration Technique for the Enumeration of Parasitic Helminth Eggs from Sewage Sludge (Adaptación de la técnica de Concentración para la enumeración de huevos de helminto parásitos provenientes de lodos residuales). *Water Res.* 1986, 20:813-816.
- 12.12 Schwartzbrod, J., L. Stien, K. Bouhoum y B. Baleux., Impacto del Tratamiento de Agua Residual sobre Huevos de Helminto. *Water Sc. Techn.* 1989, 21:295-297.

13 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

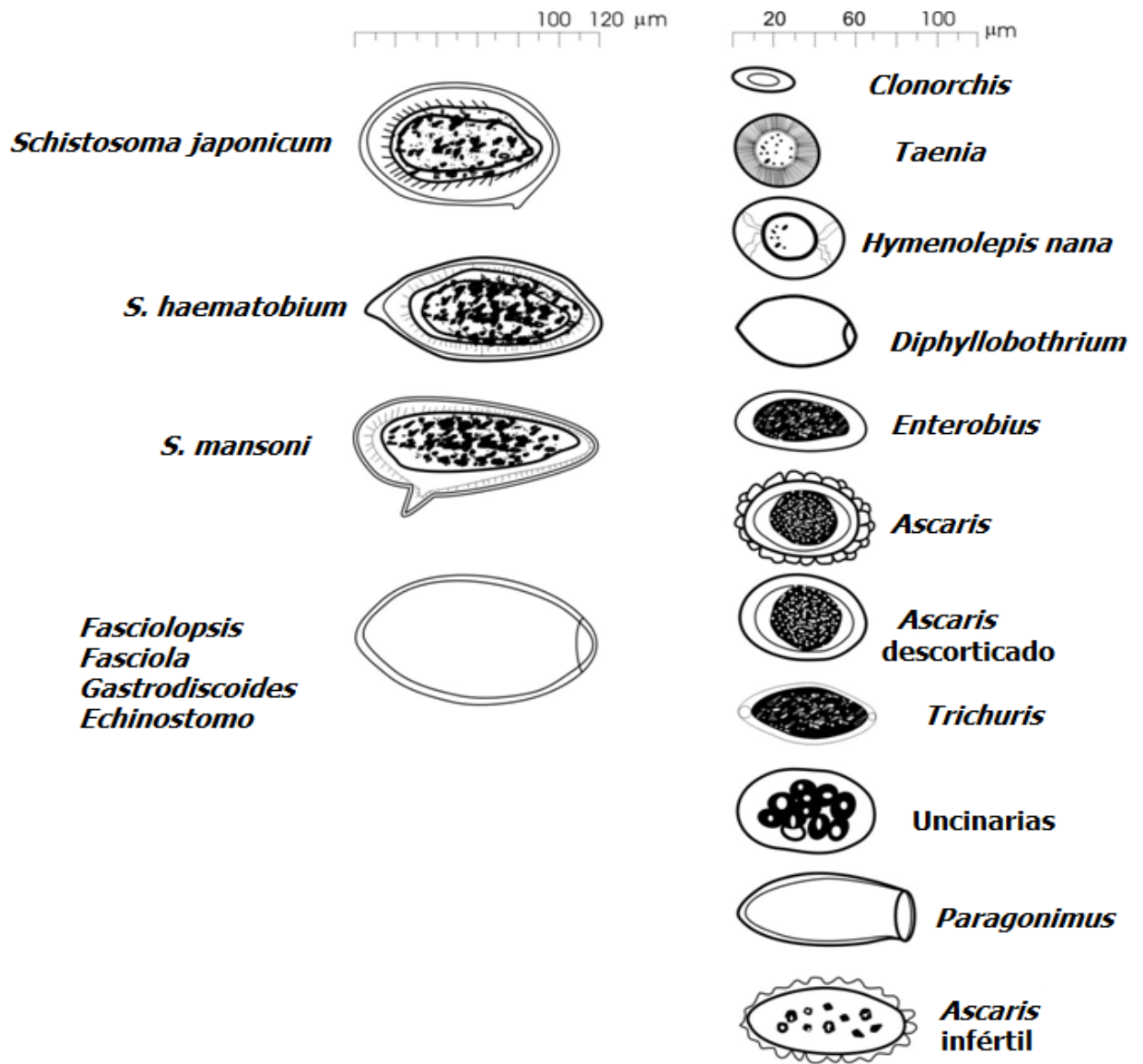
Esta norma mexicana no equivale a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

MÉXICO, D.F. A
LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS.

CARMEN QUINTANILLA MADERO.

JADS/LFVO/DLR/mrg.

ANEXO 2- Diagramas de huevos de helmintos de importancia médica
(Ayres, 1989).



ANEXO 3- Clasificación de tres diferentes calidades agua residual utilizadas para la validación del sistema.

Calidad del agua residual	Tipo de proceso que la produce	ST (mg/L)	Contenido de helmintos (HE/L)	Proceso de tratamiento equivalente	ST (mg/L)
Clase I	Lodos activados + sedimentación + filtración	0.5 – 0.97	0.0 – <0.2		<15
	Efluente de un proceso fisicoquímico + filtración	1.0 – 3.0	0.0 – 1.0	Tratamiento terciario: coagulación/floculación, filtración con medio dual o filtración con arena de baja densidad, filtración con medio dual, filtración de membrana	
	Lodos activados + sedimentación secundaria	3 – <15	0.4 – 1.0	Tratamiento secundario: filtro percolador + sedimentación secundaria, o, lagunas de estabilización + tanques de sedimentación	
Clase II	Efluente de un proceso físico químico	>15 – 40	1.2 – 2.0	Tratamiento primario avanzado: coagulación/floculación + sedimentación	>15 - 150
	Tratamiento primario	>40 – 150	8.0 – 15	Procesos biológicos de baja tasa: lagunas de estabilización, efluentes de almacenamiento y embalses, humedales Procesos biológicos de alta tasa (Tratamiento primario): sedimentación primaria, sedimentación ayudada químicamente, UASB (reactor de flujo ascendente)	
Clase III	Agua residual municipal sin tratar	240 – 763	13 – 70	Agua residual cruda municipal	>150 – 1200

Fuente: Metcalf & Eddy, 1991; WHO, 2006.