

## Análisis parasitológico en fuentes de agua para consumo de la ciudad de Bahía Blanca y zona de influencia

### Parasitological analysis in drinking water sources from Bahía Blanca city and its area of influence

Randazzo Viviana<sup>1,2</sup>, Lucchi Leandro<sup>1</sup>, Basabe Norma<sup>1,2</sup>, La Sala Luciano<sup>1,3</sup> y Visciarelli Elena<sup>1</sup>

**RESUMEN:** La escasez del recurso hídrico ha incrementado en los últimos años la reutilización de aguas depuradas y de fuentes alternativas para consumo, riego y/o recreación. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud recomienda alcanzar niveles mínimos de calidad que aseguren la preservación de la salud humana y el ambiente. Un riesgo evidente lo constituye la ingesta y el uso recreativo de agua contaminada con materia fecal humana o de animales. *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. y otras amebas de vida libre (AVL) son agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por el agua. El objetivo de nuestro trabajo fue buscar e identificar formas parasitarias de importancia en salud humana, en cuerpos de agua de Bahía Blanca y la región. Se recolectaron muestras de agua del Embalse Paso de las Piedras y sus afluentes naturales. En cada sitio se registró temperatura, pH, conductividad eléctrica y turbidez del agua. Se realizó un filtrado y análisis microscópico directo de los pellets, y coloración de Kinyoun para la identificación de *Cryptosporidium* spp. Se hallaron huevos y larvas compatibles morfológicamente con miembros de la familia Ancylostomatidae. En todas las muestras estudiadas se aislaron AVL morfológicamente compatibles con el género *Acanthamoeba*. El 100 % de los aislamientos fue confirmado por tipificación molecular como perteneciente a dicho género. La presencia de estos potenciales patógenos en las muestras obtenidas indica que es necesario implementar un sistema de vigilancia sobre los cursos de agua que abastecen a la ciudad.

**Palabras clave:** agua, parásitos, salud humana

**ABSTRACT:** The global shortage of fresh water resources has recently led to the reuse of purified water and alternative sources for consumption, irrigation and recreation. In this sense, the World Health Organization recommends attaining minimum water quality levels to ensure both the public and environmental health. The direct consumption and recreational use of water bodies polluted with either human and/or animal feces represent an evident risk. *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and other free-living amoebas (FLA) are etiological agents associated with waterborne diseases. The objective of this work was to search and to identify parasites of public health concern in water bodies from the Bahía Blanca city and its watershed. Water samples from Embalse Paso de las Piedras and its natural tributaries were collected. Water temperature, electrical conductivity, and turbidity were recorded at each sampling site. Samples were filtered and analyzed microscopically, and the Kinyoun staining was used for the *Cryptosporidium* spp. identification. Eggs and larvae morphologically compatible with members of the family Ancylostomatidae were found. The FLA morphologically compatible with *Acanthamoeba* spp. were isolated in all studied samples. All isolates were confirmed as *Acanthamoeba* spp. by molecular typification. The presence of these potential pathogens in the analyzed samples underline the importance of maintaining a surveillance system in the city's natural water supplies.

**Keywords:** water, parasites, human health

<sup>1</sup> Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Microbiología y Parasitología, Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (CONICET - Universidad Nacional del Sur), Bahía Blanca, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la buena calidad del agua proporciona beneficios para la salud, por lo que resulta fundamental maximizar los esfuerzos para el emprendimiento de acciones que logren la inocuidad efectiva del agua de consumo (WHO, 2017). Un riesgo importante para la salud es la ingesta de agua contaminada con materia fecal humana o de animales (Baldursson y Karanis, 2011) ya que los excrementos pueden ser fuente de parásitos, tanto protozoarios como helmintos. El agua de consumo no debe contener quistes, ooquistes, trofozoítos, huevos ni larvas de parásitos.

Protozoarios como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba* spp. pueden ser agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por el agua (WHO, 2017). Las amebas de vida libre (AVL) son protistas de amplia distribución en la naturaleza que tienen a los cuerpos de agua como nichos ecológicos normales. La presencia de cantidades relativamente altas de nutrientes y carbono orgánico biodegradable, junto con temperaturas cálidas y altas cargas bacterianas favorecen la proliferación de AVL (WHO, 2017). Por otro lado, la presencia de amebas en cuerpos de agua es un bioindicador del recurso hídrico, debido a la capacidad de las amebas de albergar en su interior endosimbiontes (bacterias, protozoarios y virus) que pueden permanecer, resistir y diseminarse en los ambientes, representando un riesgo sanitario y ambiental (Mella et al., 2016).

El objetivo de nuestro trabajo fue buscar e identificar formas parasitarias de importancia en salud humana en cursos y cuerpos de agua de Bahía Blanca, Punta Alta y zonas aledañas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Desde agosto de 2018 hasta junio de 2019 se recolectaron 13 muestras de agua obtenidas del Embalse Paso de las Piedras y de sus afluentes: el Río Sauce Grande y el Arroyo El Divisorio, y de fuentes de agua superficial consideradas alternativas para el consumo, representadas por los arroyos Sauce Chico y Napostá. En estos últimos arroyos se tomaron muestras en dos lugares distintos del curso de agua distantes entre sí, 3,3 km en Sauce Chico y 12,8 km en el curso del arroyo Napostá.

En cada sitio se registraron datos de temperatura, pH, conductividad eléctrica y turbidez del cuerpo de agua. Se obtuvieron satelitalmente los datos climáticos de cada área. Para la investigación de helmintos y protozoarios se filtró en cada sitio un volumen de 450 litros usando cartuchos filtrantes de polipropileno de 1 µm de poro nominal. Se utilizó una bomba portátil marca Flojet serie 4000, con caudal de 19 litros por minuto, con una fuente de alimentación de 12 voltios

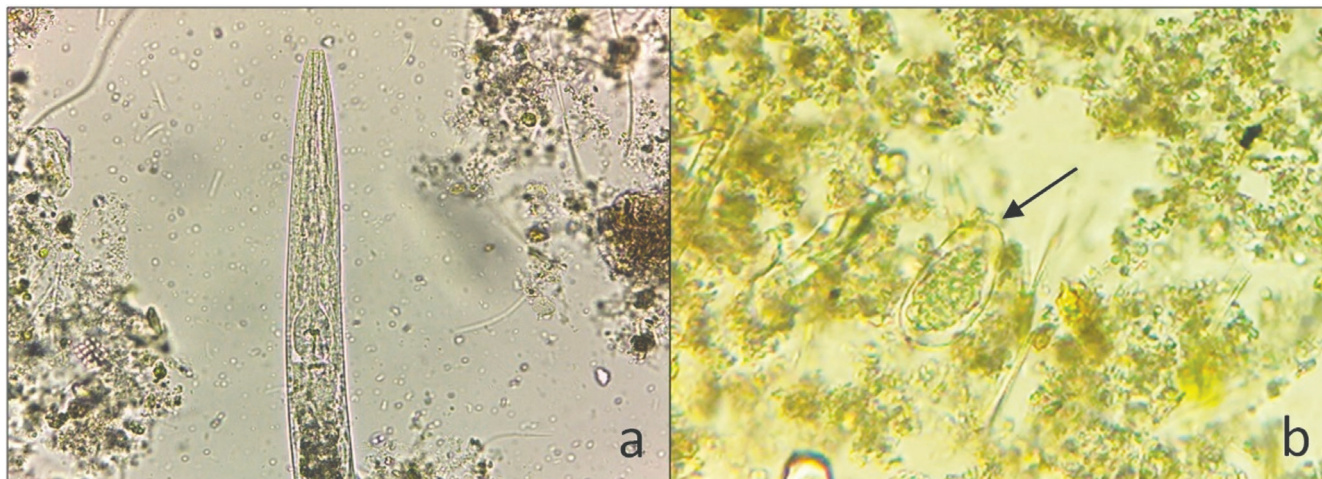
En el laboratorio, los filtros fueron procesados de acuerdo a la técnica descrita por Madore et al. (1987). Se lavaron los filtros en forma reversa, empleando 2,7 litros de una solución Tween 80 al 0,1% (v/v) y luego se desmenuzaron sobre la misma solución de Tween 80. Posteriormente se centrifugaron hasta volumen cero a 1200 g durante 10 minutos. Los pellets resultantes fueron colocados en un mismo frasco y lavados nuevamente por duplicado. Esta última muestra fue fraccionada en dos partes. Una porción fue almacenada en heladera como reserva para procedimientos de identificación aplicando ensayos inmunocromatográficos y de microscopía de inmunofluorescencia. La otra porción fue colocada en una solución de formol 5% (v/v) para la búsqueda e identificación al microscopio óptico (MO) de formas parasitarias: huevos, larvas, quistes y/o trofozoítos. Los pellets fueron observados al MO a 100, 400 y 1000 aumentos.

A todos los pellets se les aplicó la coloración de Kinyoun (Isenberg, 1992) para la determinación de *Cryptosporidium* spp. y otros coccidios de interés sanitario.

Para investigar la presencia de AVL, las muestras de agua se recolectaron en frascos estériles de vidrio de 470 ml, utilizando la técnica de inmersión, a 20 cm de profundidad. Posteriormente, las mismas se dejaron sedimentar en el laboratorio durante 24 horas descartando la parte superior, y conservando para su análisis 40 ml de cada muestra. De este volumen, y post-centrifugación durante 10 minutos a 1200 g, se obtuvieron sedimentos con los que se realizaron cultivos y observaciones directas al MO con 100 y 400 aumentos. Se sembraron 100 µl de muestra de agua en agar no nutritivo (ANN) por duplicado, se adicionaron 500 µl de una suspensión de *Escherichia coli* (cepa ATCC) en solución de Page y se incubaron a dos temperaturas, 37 °C y 42 °C, para investigar la presencia de especies termófilas.

Para comprobar el desarrollo de las AVL se realizaron observaciones microscópicas a partir de las 24 horas, identificándolas en base a sus características morfológicas (Page, 1988). Las placas con ausencia de crecimiento fueron consideradas negativas luego de 15 días de incubación. Con el objetivo de investigar la presencia del género *Naegleria*, se realizó la prueba de transformación amebo-flagelar (TAF). El ADN genómico se extrajo con el kit comercial Quick- gDNATM MiniPrep de ZYMO RESEARCH. Para la amplificación y tipificación por PCR se aplicaron los protocolos descritos por Schroeder (2001) y Regoudis y Pélandakis (2015).

Los cultivos tipificados fueron conservados para su posterior investigación de endosimbiontes.



**Figura 1.** a) Larva rabditoide y b) Huevo, compatibles con la familia Ancylostomatidae al MO a 400 aumentos.

## RESULTADOS

En la observación directa al MO de los pellets de las muestras filtradas correspondientes al cauce del río Sauce Chico se hallaron larvas rabditoideas (Nematoda) y huevos con características morfológicas compatibles con la familia Ancylostomatidae (Nematoda) (Adrián *et al.*, 2002) (Fig.1).

Las tinciones de Kinyoun en los frotis de pellets de agua para la búsqueda de *Cryptosporidium* spp. y otros coccidios arrojaron resultados negativos para todas las muestras.

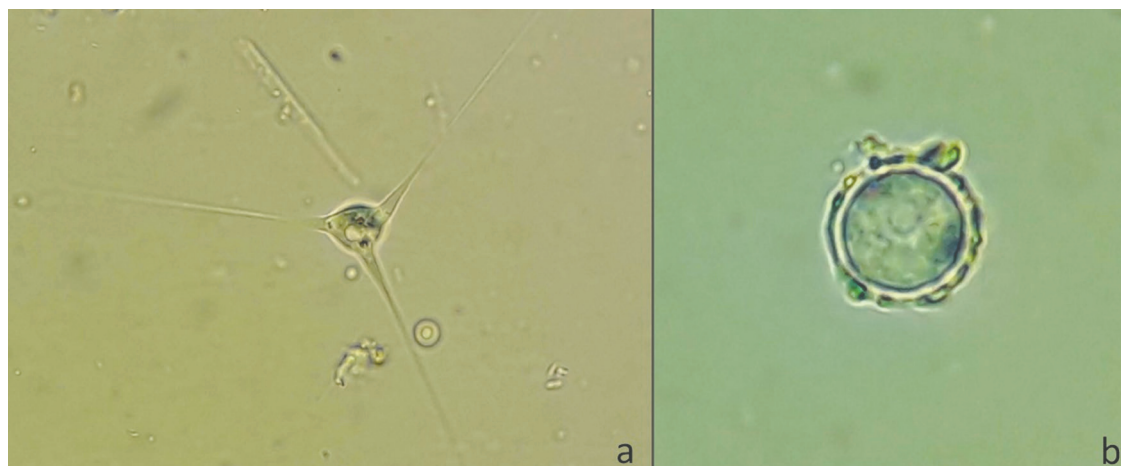
Los aislamientos parasitarios se correspondieron con temperatura media del agua de 17,2 °C, con un mínimo de 9 °C y un máximo de 25 °C, con valores de pH que oscilaron entre 7,5 y 8,9 upH, con una media geométrica de 7,1 upH, los registros de conductividad oscilaron entre 418 y 1530  $\mu$ S/cm con media de 917  $\mu$ S/cm, y temperatura ambiente entre 8 °C y 26 °C.

En cuanto a la investigación de AVL, todas las muestras cultivadas resultaron positivas. Se observaron trofozoítos y quistes ornamentados y lisos, de pequeño tamaño ( $\leq 15 \mu$ m) morfológicamente compatibles con *Acanthamoeba* spp. (Fig. 2). El 100 % de los aislamientos fue confirmado por tipificación molecular con el género *Acanthamoeba*.

## DISCUSIÓN

La presencia de huevos, larvas de helmintos y amebas en las muestras de agua analizadas en este estudio indican que es necesario implementar un sistema de vigilancia sobre los cursos de agua que abastecen la ciudad. Estos resultados concuerdan con los reportados localmente en estudios previos realizados por el gobierno municipal de Bahía Blanca (Municipalidad de Bahía Blanca, 2014). Asimismo, trabajos publicados en diferentes regiones por otros autores revelan la presencia de agentes parasitarios en aguas superficiales empleadas para consumo (Gertiser, 2015; Juárez y Sandoval, 2021).

Entre los patógenos parasitarios, *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* son tres de las principales causas de enfermedades diarreicas producidas por protozoos y los que con mayor frecuencia son causantes de brotes de enfermedades transmitidas a través del agua (Baldursson y Karanis, 2011). El control de la transmisión de parásitos por el agua plantea retos importantes ya que los quistes, ooquistes y/o huevos de parásitos son extremadamente resistentes a los procesos utilizados para la desinfección del agua, y en algunos casos su pequeño tamaño hace difícil eliminarlos mediante los



**Figura 2.** a) Trofozoítos y b) Quistes, compatibles con el género *Acanthamoeba* al MO a 1000 aumentos.

procesos de filtración. En muestreos futuros, se prevé aumentar la sensibilidad en la detección de quistes de *G. lamblia*, *Entamoeba* spp. y *Cryptosporidium* spp., a partir de analizar las muestras por Inmuncromatografía con CerTest Crypto + *Giardia* + *Entamoeba* combo card test® de CerTest Biotec.

Los resultados concuerdan con la gran distribución que presentan las AVL en la naturaleza y su capacidad para habitar diversos cursos de agua con diferentes condiciones fisicoquímicas. Estudios recientes acerca de la calidad bacteriológica en el arroyo Napostá arrojaron recuentos medios de *E. coli* superiores a 7700 UFC/ 100 ml con alto contenido de materia orgánica disuelta por descargas cloacales discontinuas (Streitenberger y Baldini, 2016), condiciones que favorecen la proliferación de AVL en el curso de agua. En este contexto las AVL actuando como carriers o vectores de microorganismos cumplirían un rol fundamental en la permanencia y diseminación de patógenos.

Teniendo en cuenta que los recursos hídricos estudiados son fuentes alternativas de abastecimiento para la comunidad, y ante estudios previos que señalan la elevada resistencia de las AVL a los tratamientos convencionales de potabilización (Gertiser, 2015), consideramos que una futura investigación de endosimbiontes en los aislamientos de AVL aportará datos valiosos acerca de la distribución y el riesgo potencial de estos protistas en las fuentes de agua de nuestra región.

La profundización en el conocimiento y sociabilización de esta econosis y otras formas parasitarias son herramientas fundamentales para emprender acciones de prevención ante el riesgo sanitario.

## FINANCIAMIENTO

SECyT UNS PGI cód. 24/B273. Proyecto PIO-UNS-CONICET "Evaluación integral de los recursos hídricos para consumo humano en la región de sudoeste bonaerense".

## LITERATURA CITADA

Adrián, A. B., Pérez Ortiz, O. G., Gómez Vera, D., Morenilla Martínez, J. J., Amores Blascos, S., Bonora I. B. *et al.* (2002). Identificación de huevos por helmintos en aguas residuales. Artículos técnicos. Tecnología del agua. Recuperado de [http://www.bibliotecagbs.com/archivos/ta\\_221.pdf](http://www.bibliotecagbs.com/archivos/ta_221.pdf). Último acceso 20 de agosto 2021.

Baldursson, S. y Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water research*, 45(20), 6603-6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>

Fernández, C. (2010). Caracterización limnológica de un ambiente eutrófico: el embalse Paso de las Piedras, Argentina. *Bioecología del fitoplancton* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Gertiser, M.L. (2015). Aspectos biológicos y epidemiológicos de Amebas de Vida Libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp. (Tesis Doctoral) Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Isenberg, H. D. (1992). *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington D.C.: American Society for Microbiology.

Juárez, Y. y Sandoval, N. (2021). Prevalencia parasitaria en diferentes fuentes de aguas de las comunidades del río Chagres en los años 2010-2019. *Crea Ciencia Revista Científica*, 13(2), 24-32. <https://doi.org/10.5377/creaciencia.v13i2.11752>

Madore, M. S., Rose, J. B., Gerba, C. P., Arrowood, M. J. y Sterling, C. R. (1987). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *The Journal of Parasitology*, 73(4), 702-705.

Mella, C., Medina, G., Flores-Martin, S., Toledo, Z., Simaluiza, R.J., Pérez-Pérez, G. *et al.* (2016). Interaction between zoonotic bacteria and free living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance. *Archivos de medicina veterinaria*, 48, 1-10.

Municipalidad de Bahía Blanca. (2014). Comité Técnico Ejecutivo. Informes. Recuperado de: <http://www.bahia.gob.ar/subidos/cte/informes2014/1.1%20-%20Subprograma%20Ria%20de%20Bahia%20Blanca.pdf>. Último acceso 10 de mayo 2021.

Page, F. (1988). *A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae*. Cumbria, England: Freshwater Biological Association.

Regoudis, E. y Pélandakis, M. (2015). Detection of the free living amoeba *Naegleria fowleri* by using conventional and real-time PCR based on a single copy DNA sequence. *Experimental Parasitology*, 161, 35-39.

Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus M. B. *et al.* (2001). Use of subgenus 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1903-1911.

Streitenberger, M. E. y Baldini, M. D. (2016). Aporte de los afluentes a la contaminación fecal del estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(2), 243-248.

United Nations World Water Assessment Programme. (2018). *The United Nations World Water Development Report: Nature-based Solutions*. Paris, UNESCO. pp 139.

World Health Organization. (2017). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum*. Recuperado de [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/drinking-water-quality-guidelines-4-including-1st-addendum/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/drinking-water-quality-guidelines-4-including-1st-addendum/en/). Último acceso 10 de mayo 2021.

Recibido: 30 de mayo de 2021

Aceptado: 16 de agosto de 2021