

Viabilidad de quistes de *Giardia* sp. en cuatro playas del Lago de Maracaibo

Zoraida Medina*, Luima Romero y Ligia Botero

¹Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental. Facultad Experimental de Ciencias.

²Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 19-10-05 Aceptado: 20-12-06

Resumen

Giardia sp. es uno de los protozoarios intestinales de mayor prevalencia en el mundo. Es identificado como el principal agente infeccioso en epidemias de diarreas originadas por consumo de agua. Debido a que este parásito puede ocasionar un problema de salud pública, se considera importante detectar su viabilidad en aguas superficiales ya que indica su potencial infeccioso. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante tinción con los colorantes fluorogénicos; diacetato de fluoroceína (DAF) y Ioduro de propidium (IP) la concentración de quistes de *Giardia* viables o no en aguas superficiales utilizadas para la recreación. El estudio se llevó a cabo en cuatro playas del Lago de Maracaibo (APUZ, Caimare Chico, Quisiro y San Carlos) durante un período de 8 meses. Se detectaron mediante DAF quistes viables de *Giardia* en 83% de las muestras positivas de APUZ, 50% de las de Caimare Chico y San Carlos y 16,6% de las de Quisiro. La tinción con IP permitió detectar quistes no viables en 50% de las muestras positivas de APUZ, en 60% de las de San Carlos, en 33% de las de Caimare Chico, y ninguno en Quisiro. El uso con fines recreacionales de las playas estudiadas representa un riesgo de sufrir enfermedades hídricas causadas por *Giardia*.

Palabras clave: Diacetato de fluoroceína; *Giardia*; ioduro de propidium; viabilidad.

Giardia sp. cysts Viability in four Lake Maracaibo beaches

Abstract

Giardia sp. is one of most prevalent intestinal protozoan. It is identified as the principal infectious agent in water related diarrhoeal disease. Considered a public health problem, it is important to detect its presence viability on surface water in order to determine its infectious potential. The goal of this work was to determine the presence of viable *Giardia* cysts in recreational water, through fluorogenic dyes fluorescein diacetate and propidium iodide. The study comprises samples from four beaches (APUZ, Caimare chico, Quisiro, San Carlos) at lake Maracaibo during 8 months. Viable *Giardia* cysts detected through DAF on 83% of the positive APUZ's samples, 50% in Caimare chico and San Carlos and 16.6% in Quisiro. No viable *Giardia* cysts detected, in 50% positive APUZ's samples, 60% in San Carlos, 33% in Caimare Chico and none in Quisiro, through dye IP. Recreational use of studied beaches represents a health hazard for waterborne diseases produced by *Giardia*.

Key words: Fluoresceine diacetate; *Giardia*; propidium iodide; viability.

* Autor para la correspondencia.

Introducción

Giardia spp. es un protozooario entérico que infecta el intestino delgado del hombre, pudiendo producir en el mismo una parasitosis asintomática o cuadros de diarrea, dolor abdominal, náusea, vómito, síndrome de mala absorción intestinal, desnutrición y anemia; lo que puede conducir a la pérdida de peso y deshidratación (1, 2). La dosis infecciosa oscila entre 1-10 quistes, para iniciar la infección (3, 4).

Numerosos brotes epidémicos de giardiasis se han descrito tanto en los países desarrollados (6-11), como en los en vía de desarrollo, incluyendo Venezuela (3-5). Numerosos brotes infecciosos han sido asociados con la ingestión de aguas superficiales no tratadas durante la realización de actividades recreacionales (7, 8, 12).

Las principales fuentes de contaminación de las aguas superficiales con quistes de *Giardia* son las heces de humanos infectados y posiblemente desechos de animales con acceso a efluentes de agua natural, tales como perros, gatos, caballos, pájaros; aunque esto último es aún controversial (12).

Debido a la importancia de este microorganismo para la salud pública, la evaluación de la calidad de las aguas debe implicar la detección del agente causal para conocer su potencialidad de transmisión hídrica, y los factores que regulan las variaciones en sus concentraciones, determinar su viabilidad y por lo tanto, su potencial para causar infecciones (13, 14).

Entre las técnicas sugeridas para la determinación de la viabilidad de quistes de *Giardia*, en cuerpos de agua, las más frecuentemente recomendadas, son el uso de los colorantes fluorogénicos; Diacetato de Fluoroceína (DAF) e Ioduro de Propidium (IP) (15-18). Estos colorantes son moléculas no fluorescentes que pueden servir de sustratos en ciertas reacciones enzimáticas. El DAF pasa a través de la membrana celular y es hidrolizado por las esterasas intracelula-

res para producir fluoresceína, ésta última acumulada muestra una fluorescencia verde cuando es excitada por una luz azul, indicando una célula viable. El IP atraviesa solamente las membranas celulares dañadas de las células muertas, se intercala con el ácido nucleico y forma un complejo fluorescente rojo brillante (19).

El objetivo de este trabajo fue determinar mediante tinción con los colorantes fluorogénicos; DAF y IP la presencia de quistes de *Giardia* viables o no, en aguas superficiales utilizadas para la recreación.

Materiales y Métodos

Lugares de muestreo

Las estaciones de muestreo se seleccionaron de acuerdo al interés recreativo que representan a nivel regional. Las mismas corresponden a las playas: APUZ (Asociación de Profesores de la Universidad del Zulia), Caimare Chico, Quisiro y San Carlos, ubicadas en el estrecho del Lago de Maracaibo y en el Golfo de Venezuela. Se analizaron un total de 24 muestras (6 en cada playa), durante un periodo de 8 meses comprendido entre Noviembre de 2001 y Junio de 2002.

Análisis parasitológico

Los muestreos y procesamiento se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Le Chevallier y col., 1995 (12). Se extrajeron 180 L de agua superficial con una bomba marca efco, modelo PA 1030, procesados a través de un filtro de cartucho de hilo de polipropileno de 1µm de porosidad nominal, CUNO Microwynd DPPPY, a una velocidad de flujo promedio de 8-10 L/min. Los filtros fueron refrigerados y trasladados al laboratorio para su procesamiento ulterior dentro de las 24 h siguientes.

Los filtros se cortaron hasta su parte central, en fibras de 5-10 cm de longitud. A fin de desprender los quistes adheridos a las fibras, éstas se colocaron en un envase conteniendo 900 mL de líquido de elusión (€);

éste compuesto de una solución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4) con 0,1% de Tween 80 y 0,1% de dodecil sulfato de sodio (SDS). El envase fue agitado durante 10 min, y luego las fibras fueron descartadas. Todo el líquido de lavado se concentró en un sedimento único por centrifugación a 4000 rpm, (utilizando una centrífuga refrigerada IEC Centra MPAR), descartándose el sobrenadante. Se diluyó 5 mL del sedimento obtenido en 20 mL de la solución de elusión y se mezcló en un vortex (Thermolyne, 37600 mixer) durante 10 min. A esta suspensión se le agregó 20 mL de una solución de percoll-sacarosa (densidad= 1,10. Sigma Chemical, Inc) y se centrifugó a 1,050 x g por 10 min a 10°C. Finalizado el tiempo de centrifugación, se extrajeron 25 mL de la capa superior e interfase que se diluyeron con 50 mL de la solución €. Luego de centrifugar (4000 rpm, 10 min) y una vez descartado el sobrenadante, se dejó un sedimento de 5 mL que fue mantenido a temperatura ambiente hasta su visualización.

Determinación de la viabilidad de los quistes de *Giardia*

Los quistes de *Giardia* fueron identificados según morfología y tamaño, según De Regnier y col. (16), mientras que su viabilidad fue determinada por fluorescencia utilizando colorantes fluorogénicos: DAF según Jarmey y col. (15) y IP según Tririat y col. (19).

Las soluciones colorantes se prepararon siguiendo el método de Jones y Sneft (19). Para ello, se preparó una solución stock de DAF (Sigma Chemical, catalogo 73789) disolviendo 10 mg en 1 mL de acetona, y a partir de ésta se preparó una solución de trabajo diluyendo 0,04 mL de solución stock en 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) a pH 7; y una solución de trabajo de IP disolviendo 5 mg (Sigma Chemical, catalogo P4170) en 50 mL de PBS a pH 7.

Para la tinción con DAF, se mezclaron, 30 µL del sedimento concentrado (obtenido

en el análisis parasitológico) con 30 µL de la solución colorante de DAF y se dejó en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, se colocaron 50 µL de la suspensión anterior en una lámina portaobjeto y se observó en inmersión bajo un aumento de 400X en un microscopio adaptado a un equipo de epifluorescencia, con una longitud de onda de excitación de 455 a 490 nm. Los quistes viables de *Giardia* observados se apreciaron de color verde intenso fluorescente, forma oval, 8-12 µm de diámetro. Para la tinción con IP, se procedió del mismo modo, cambiando la solución de DAF por la de IP y la longitud de onda de excitación fue de 545 a 546 nm. Los quistes no viables de *Giardia* se apreciaron de color rojo intenso fluorescente, redondeados de 4 a 6 µm de diámetro. La concentración de quistes *Giardia* en número de quistes por litro de muestra colectada.

Resultados y Discusión

Los resultados de los conteos de quistes de *Giardia* viables y el porcentaje de muestras positivas obtenidas empleando las tinciones de DAF y IP, se representan en las Tablas 1 y 2. La tinción con DAF permitió detectar quistes viables de *Giardia* en 12/24 (50%) de las muestras analizadas, de las cuales el 83% correspondieron a APUZ, el 50% a Caimare Chico y San Carlos y el 16,6% a Quisiro. Del mismo modo, la tinción con IP permitió detectar quistes no viables en 9/24 (37,5%) de las muestras analizadas, de las cuales el 60% a San Carlos, el 50% correspondieron a APUZ, el 33% a Caimare Chico y ninguno en Quisiro.

El análisis de los resultados indican que los quistes de *Giardia* viables están presentes comúnmente en las aguas superficiales de las zonas estudiadas. Estos hallazgos coinciden con lo señalado por otros autores en relación a la amplia distribución, espacial y temporal de este parásito en muestras ambientales (10, 11).

Tabla 1
Número de quistes de *Giardia* viables y porcentaje de muestras positivas en aguas superficiales.
Tinción con Diacetato de Fluoresceína.

Playa	Quistes de <i>Giardia</i> viables por litro						%
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
APUZ	5,55	11,1	222	0	600	200	83
Caimare Chico	11,1	0	11,1	0	0	200	50
Quisiro	0	0	0	5,55	0	0	16,6
San Carlos	5,55	16,7	72,2	0	0	0	50

M1.....M6: Muestra 1.....Muestra 6.

Tabla 2
Número de quistes de *Giardia* no viables y porcentaje de muestras positivas en aguas superficiales.
Tinción con Ioduro de Propidium.

Playa	Quistes de <i>Giardia</i> no viables por litro						%
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
APUZ	10,6	18,9	25,6	0	0	0	50
Caimare Chico	22,2	0	16,7	0	0	0	33
Quisiro	0	0	0	0	0	0	0
San Carlos	16,7	128	94,4	5,55	0	0	60

M1.....M6: Muestra 1.....Muestra 6.

El análisis de los resultados de los estudios realizados, empleando los métodos de coloración DAF e IP, para determinar la viabilidad o no de *Giardia* demostraron que el mayor porcentaje de muestras positivas correspondió a quistes viables, en muestras de la playa APUZ (83%), seguido de Caimare Chico y San Carlos, con igual porcentaje para ambos (50%) y con menor porcentaje, en playa Quisiro (16,6%) (Tabla 1). El mayor porcentaje de quistes no viables fue encontrado en San Carlos.

La playa APUZ ha sido declarada como no apta para uso recreacional según estudios bacteriológicos realizados por organismos oficiales venezolanos (23). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia de quistes de *Giardia* viables en esta playa corrobora el riesgo que representa a la salud de los usuarios la utilización de

esta agua para su recreación. Probablemente los porcentajes encontrados son indicadores de la deficiencia en saneamiento ambiental básico y a bajo nivel de hábitos higiénicos de gran parte de la población que habita en la zona, así como la descarga continua de desechos residuales, domésticos e industriales sin ningún tipo de tratamiento (24).

Las muestras analizadas en Caimare Chico, Quisiro y San Carlos aunque presentaron menor porcentaje de *Giardia* viables, igual representan un riesgo de enfermedades gastrointestinales para los usuarios, ya que la ingestión de un quiste viable puede representar una dosis infecciosa suficiente para ocasionar enfermedades en el hombre (3, 4). La contaminación de estas playas con materia fecal puede deberse a la descarga de aguas residuales no tratadas provenientes de los asentamientos poblacionales adyacentes a esta zona.

Otra fuente de contaminación es la presencia de animales en sus cercanías.

Otro aspecto que es importante tomar en consideración es que las tres playas mencionadas anteriormente, durante el periodo de este estudio, fueron declaradas aptas para uso recreacional por los organismos competentes en esta materia (24), mediante la realización de análisis bacteriológicos. Este trabajo permite recomendar que los métodos bacteriológicos utilizados para conocer calidad microbiológica de las aguas deban ser acompañados de estudios parasitológicos, debido a que los parásitos son más resistentes a las condiciones ambientales que las bacterias indicadoras de contaminación fecal, como ha sido demostrado por diversos investigadores (5, 7, 8).

El control efectivo de los protozoarios intestinales y sus agentes causales es sin duda alguna, la prevención. La instauración de buenos servicios públicos (agua potable, disposición y deposición de las excretas, disposición de basura) acompañados de un programa de educación sanitaria ayudaría de gran manera a disminuir considerablemente el grado de contaminación de las aguas del Lago de Maracaibo. Lamentablemente en Venezuela, como en otros países tropicales, los servicios públicos son deficientes y no llegan a toda la población por igual, esto aunado a la baja formación sanitaria impartida en el hogar y en las escuelas.

Conclusiones

Se concluye que para establecer la calidad microbiológica de aguas superficiales de uso recreacional se debe investigar además de lo establecido en la normativa para este tipo de agua, la presencia y viabilidad de quistes de *Giardia*.

Este estudio demostró que los colorantes fluorogénicos DAF e IP pueden ser usados para determinar la viabilidad de quistes de *Giardia* spp, tal y como lo indica Schupp y col. (25).

Agradecimiento

Este estudio fue financiado por la Agenda de Investigación para la Cuenca del Lago de Maracaibo: Iniciativa Regional (PDVSA, FONACIT FUNDACITE-ZULIA e ICLAM). Se agradece al Instituto para la Conservación de la Cuenca del Lago de Maracaibo (ICLAM) por la ayuda en la definición de los sitios de muestro.

Referencias Bibliográficas

1. ADAM R. *Adv Parasitol* 32: 72-133, 1993.
2. CHACIN-BONILLA L., RUBIO F., CUAMO Y., AÑEZ S. *Invest Clin* 25:11-24, 1984.
3. CHOURIO G., RINCON W., CASTELLANO M., LUZARDO T., MELEAN C. *Kasmera* 16:30-47, 1988.
4. DE REGNIER D., COLE L., SCHUPP D., ERLANSEN S. *Appl Environ Microbiol* 55: 1223-1229, 1989.
5. DIAZ I., CHOURIO G., ALVAREZ M., AÑEZ O., MORON A., ROMERO E. *Kasmera* 20:1-4, 1992.
6. ERLANDSEN S., BEMRICK. Waterborne giardiasis: sources of *Giardia* cysts and evidence pertaining to their implication in human infection. En: P. M. Wallis and B.R. Hammond (ed.), *Advances in Giardia* research. The University of Calgary Press, Calgary (Canada), p. 227-236, 1987.
7. Ho BSW., TAM TY. *Wat Sci Tech* 38: 73-76, 1998a.
8. Ho BSW., TAM TY. *Wat Res* 32: 2860-2864, 1998b.
9. HUNTER P. Giardiasis. En: John Wiley & Sons (Ed), *Waterborne Disease*, Chichester, p. 68-79, 1997.
10. JARMEY-SWAN C., GIBSS R., HO G., BAILEY I., HOWGRAVE-GRAHAR A. *Wat Res* 34:1948-1951, 2000.
11. KENT G., GREENSPAN J., HERNDON J., MOFENSON L., HARRIS J., ENG T., WASKIN H. *Am J Publ Health* 78(2):139-143, 1988.

12. LE CHEVALLIER M., NORION J., SIEGEL J., ABBASZADEGAN M. **Appl Environ Microbiol** 61: 690-697, 1995.
13. MACKENZIE W., HOXIE N., PROCTOR M., GRADUS M., BLAIR K., PETERSON D., KAZMIERCZAK J., ADDISS D., FOX K., ROSE J., DAVID J. **Eng J Medicine** 331(3): 161-167, 1994.
14. MAHBUBANI M., BEJ A., PERLIN M., SCHAEFFER F., JAKUBOWSKI W., ATLAS R. **Appl Environ Microbiol** 57: 3456-3461, 1991.
15. SAUH J., FLANIGAN D., GALVIN M., BERMAN D. **Appl Environ Microbiol** 57: 3243-3247, 1991.
16. SYKORA J., SORBER C., JAKUBOWSKI W., CASSON L., GAVAGHAN D., SHAPIRO M., SCHOTT M. **Wat Sci Tech** 24: 187-192, 1991.
17. SMITH J. **J Food Protection**. 56: 451-461, 1993.
18. THIRIAT L., SIDANER F., SCHWARTZBROD J. **Lett Appl Microbiol** 26: 237-242, 1998.
19. JONES K., SNEFT J. **J Histochem Cytochem** 33: 77-79, 1985.
20. THOMPSON R., REYNOLDS J., MENDIS H. **Adv Parasitol** 32:72-133, 1993.
21. YEH C., HIS B., FAULK P. **J Immunol Methods** 43: 269-275, 1981.
22. QUINTERO W., ROSE J. **Vet Parasitol** 126: 219-234, 2004.
23. MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES (MARN). Dirección Regional de Calidad Ambiental. Manual del Taller de Gestión Integral de Playas. 2000.
24. ICLAM. INSTITUTO PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CUENCA DEL LAGO DE MARACAIBO. Cartelera General. Balnearios Aptos. 2003.
25. SCHUPP D., ERLANDSEN S. **Appl Environ Microbiol** 53: 704-707, 1987.