

## QUISTES DE *GIARDIA* EN AGUAS NEGRAS

### *GIARDIA* CYSTS IN RAW SEWAGE

L. Botero de L.\*; W. Quintero\*\*; Z. Medina de S\*\*\*;  
C. Oliveros\*\*\*\*

#### RESUMEN

El estudio de las aguas negras ha sido propuesto para conocer el estatus de infección de una comunidad y para indicar la presencia y variación estacional de los agentes infecciosos. Esta investigación fue llevada a cabo para evaluar un método para determinar la concentración de quistes de *Giardia* en aguas negras. En una primera etapa se realizó la prueba de eficiencia de recuperación de quistes siguiendo el método de floculación con carbonato de calcio descrito por Vesey y cols., 1993, a partir de muestras estériles de aguas negras y agua destilada sembradas con una concentración conocida de quistes. En una etapa siguiente fueron analizadas muestras de aguas negras. Los quistes de *Giardia* fueron cuantificados con un hemocitómetro luego de la concentración

\* Profesora Titular de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Autor de correspondencia.

\*\* Lic. en Biología.

\*\*\* Profesora Agregada de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.

\*\*\*\* Estudiante de Pregrado de la Licenciatura en Biología.

de éstos en solución de sacarosa (gravedad específica 1,15) o mediante centrifugación simple. La eficiencia de recuperación osciló entre 66% y 75% para las muestras de aguas negras y agua destilada respectivamente. Las recuperaciones mayores (87%) fueron obtenidas cuando se omitió el paso de clarificación. Las concentraciones de quistes de *Giardia* estuvieron entre  $2 \times 10^3$  y  $3.7 \times 10^4$  quistes/ml.

**Palabras claves:** Aguas negras, quistes de *Giardia*, método de floculación, eficiencia de recuperación.

### ABSTRACT

The study of raw sewage has been proposed to determine the infection status of a community and to indicate the presence and seasonal variation of infectious agents. This research was carried out to evaluate a method for determining *Giardia* cyst concentrations in raw sewage. Initially, cyst recovery efficiency tests were conducted. For that purpose, sterilized samples of distilled water and raw sewage seeded with a known concentration of *Giardia* cysts were processed according to the calcium carbonate flocculation method described by Vesey et. al.,1993. Secondly, raw sewage samples were analyzed by the same method. Cysts were quantified with a hemocytometer after being concentrated by flotation in a sucrose solution (specific gravity 1.15) or by simple centrifugation. Recovery efficiency ranged between 66% and 75% for raw sewage samples and distilled water, respectively. Higher recoveries (87%) were obtained where sucrose flotation clarification was omitted. The concentration of *Giardia* cysts in raw sewage were between  $2 \times 10^3$  and  $3.7 \times 10^4$  cysts/ml.

**Keywords:** Raw sewage, *Giardia* cysts, flocculation method, recovery efficiency.

## INTRODUCCION

El protozooario flagelado *Giardia* sp. es un parásito entérico que infecta el intestino delgado del hombre produciendo diarrea, flatulencia, dolor abdominal, fatiga y anorexia<sup>1,2,14,17</sup>. La infección es transmitida principalmente por la ruta oral-fecal<sup>17</sup>. La fuente potencial de quistes de *Giardia* la constituyen principalmente las heces de los humanos infectados, las cuales contaminan las aguas que el hombre utiliza para su consumo o recreación<sup>2,9,15</sup>. De uno a diez quistes son suficientes para iniciar la infección<sup>1,2,10,17</sup>. La presencia de *Giardia* en el agua varía con el área geográfica y el clima, la persistencia endémica de la enfermedad así como con los niveles de higiene y las características culturales y socioeconómicas de la población<sup>7,8,15</sup>. Diversos estudios realizados en nuestro medio, han demostrado mediante el examen de heces alta incidencia de esta parasitosis<sup>3,4,5,6</sup>.

El estudio de heces ha sido el método aceptado tradicionalmente para determinar la prevalencia de infección con parásitos; sin embargo, los resultados obtenidos en estudios realizados en poblaciones no pueden ser extrapolados a la comunidad entera y realizar investigaciones con número suficiente de muestras de heces, que permitan discernir tendencias temporales y geográficas, resulta impráctico desde el punto de vista logístico y económico<sup>9</sup>. Jakubowski y cols.<sup>9</sup>, han propuesto el estudio de la presencia de quistes de *Giardia* en aguas para conocer el estatus de infección de una comunidad. El examen de las aguas negras ha sido usado ya con anterioridad para detectar portadores en la población de fiebre tifoidea, paratifoidea y cólera<sup>12</sup> y para indicar presencia y variación estacional de virus entéricos<sup>9</sup>.

La detección y enumeración de quistes de *Giardia* en agua no había sido recomendado antes debido principalmente a que los métodos de detección de este parásito en agua eran inadecuados, sin embargo recientemente Vesey y cols.<sup>18</sup>, han propuesto un método para la recuperación de oquistes de *Cryptosporidium* en

muestras ambientales. Este trabajo tuvo por objetivo evaluar este método para la detección de quistes de *Giardia* en aguas negras.

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizó la prueba de eficiencia del método para la recuperación de quistes empleando muestras estériles de 1L de agua destilada y de aguas negras tomadas en el colector C de Hidrolago que llega a las Lagunas de estabilización de La Universidad del Zulia. En la segunda etapa se procesaron muestras de aguas negras colectadas también a la entrada de las lagunas de estabilización.

**Prueba de Eficiencia:** Las muestras de agua destilada y de aguas negras, fueron esterilizadas en autoclave. Se dejaron en reposo durante la noche y al día siguiente fueron sembradas con 10 ml de un pool de *Giardia* que contenía  $8.5 \times 10^4$  quistes/ml preparado a partir de heces de pacientes con giardiasis mediante la técnica de concentración formol-éter<sup>13</sup>.

**Procesamiento de las muestras:** Todas las muestras fueron procesadas empleando la técnica de precipitación con carbonato de calcio, descrita por Vesey y cols., en 1993 para la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas<sup>18</sup>. La suspensión obtenida fue sometida a flotación en solución de sacarosa (gravedad específica, 1.15) y se recuperó la fase ubicada por encima de la interfase, descartando el remanente. En algunos casos se omitió el paso de flotación para evaluar la pérdida de recuperación de los quistes durante este proceso. Finalmente a la fase recuperada, se le agregó solución de formaldehído al 10% (1:5) y se almacenó a 4°C Los quistes de *Giardia* fueron identificados por su tamaño, forma y presencia de caracteres morfológicos internos (axonema, cuerpo mediano y núcleo<sup>1,2,8,9</sup>. Las concentraciones de quistes fueron determinadas por contaje directo empleando un hemocitómetro<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de los experimentos de eficiencia de recuperación de los quistes sembrados. El conteo de los quistes de *Giardia* por mililitro osciló entre 53000 y 75000 para las muestras de agua destilada y 39500 y 75000 para muestras de aguas negras.

Los porcentajes promedio de eficiencia de recuperación de los quistes fueron de 75% para muestras de agua destilada y para las muestras de aguas negras 66%.

El Cuadro 2 muestra los resultados correspondientes a la evaluación del proceso de flotación y el Cuadro 3 presenta la concentración de quistes de *Giardia* encontradas en las muestras de aguas negras. Los valores obtenidos oscilaron entre  $2 \times 10^3$  y  $3.7 \times 10^4$  quistes/ml.

### Cuadro 1

#### Eficiencia de recuperación de quistes de *Giardia* en muestras de agua sembradas con $8.5 \times 10^4$ quistes/ml

Muestreo	Tipo de Agua	N° de Quistes/ml	% de Recuperación
I	Agua destilada	53000	62
	Agua negra	75000	87
II	Agua destilada	72500	84
	Agua negra	53750	63
III	Agua destilada	58750	68
	Agua negra	39500	46
IV	Agua destilada	75000	87
	Agua negra	60000	70
% Promedio de Eficiencia de Recuperación	Agua negra		66
	Agua destilada		75

## Cuadro 2

Evaluación de la técnica de flotación para la recuperación de quistes de *Giardia*

Procedimiento	Quistes Recuperados (quistes/ml)
Sin flotación	$5 \times 10^4$
Con flotación <sup>1</sup>	$5.3 \times 10^4$
Con flotación <sup>2</sup>	$2.0 \times 10^3$

1 Colectando todas las fases ubicadas por encima del sedimento.

2 Colectando únicamente la fase ubicada por encima de la interfase.

## Cuadro 3

Concentración de quistes de *Giardia* en aguas negras

Muestreo	N° de Quistes/ml
I	$3.7 \times 10^4$
II	$3.0 \times 10^4$
III	$2.0 \times 10^4$
IV	$2.0 \times 10^3$

## DISCUSION

Los resultados de las pruebas realizadas para determinar la eficiencia de la metodología a aplicar en la recuperación de quistes de *Giardia*, demostró que la técnica es eficiente. Se obtuvieron valores similares a los reportados por Vesey y cols.<sup>18</sup>, quienes empleando la misma técnica para la recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium*, obtuvieron porcentajes entre 69% y 79%. En este trabajo en las muestras de agua negra y de agua destilada sembradas con quistes de *Giardia*, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 46% y 87% y 62% y 87% respectivamente.

Ha sido señalado por diversos autores<sup>11,16</sup> que durante la fase de flotación de las muestras se pierden quistes, por lo que la flotación con sacarosa puede ser eliminada sin afectar grandemente los resultados finales. Con el fin de comprobar si hay pérdida de quistes durante este proceso, se realizaron pruebas sometiendo algunas muestras al proceso de flotación con sacarosa y en otros casos omitiéndolo. Los datos obtenidos demostraron que el conteo más alto de quistes de *Giardia* ( $7.5 \times 10^4$  quistes/ml) se presentó cuando se omitió el paso de flotación. Cuando las muestras fueron flotadas el mayor conteo ( $5.3 \times 10^4$  quistes/ml) se obtuvo al recuperar todo el sobrenadante ubicado por encima del sedimento y el conteo más bajo ( $2 \times 10^3$  quistes/ml) al recuperar únicamente el sobrenadante ubicado por encima de la interfase. Estos resultados confirman que existe una pérdida de quistes de *Giardia* durante los pasos de concentración y que el procedimiento de flotación es el principal responsable de esta pérdida. Norton y cols.<sup>11</sup>, sugieren que si no se requiere clarificar la muestra, el paso de flotación puede ser omitido, esto ahorra tiempo, dinero y disminuye el número de quistes que se pierden durante el proceso. La clarificación de la muestra se requiere cuando la detección de los quistes de *Giardia* va a ser realizada mediante inmunofluorescencia ya que el material contaminante interfiere con la visualización de éstos.

Los valores de quistes de *Giardia* encontrados en las aguas negras son similares a los reportados por investigadores de Francia, India y EE.UU.<sup>7,15,16</sup>. Estos resultados se relacionan con lo señalado por otros investigadores<sup>14</sup> de que la giardiasis es prevalente tanto en países desarrollados como en los países subdesarrollados. Si se toma en cuenta que el promedio de eficiencia de la técnica para aguas negras es de 66% de acuerdo con nuestros resultados, esto significa que en realidad el número de quistes presentes estaría entre  $8.0 \times 10^4$  y  $1.1 \times 10^5$  quistes/ml. Estos valores elevados eran predecibles ya que son un reflejo de las deficiencias en saneamiento ambiental básico y el bajo nivel de los hábitos higiénicos de gran parte de la población cuyas aguas negras fueron estudiadas.

Este trabajo presenta por primera vez en Venezuela resultados de detección y número de quistes de *Giardia* en aguas negras, empleando una técnica eficiente, de bajo costo y que requiere de equipo sencillo, por lo que es aplicable a la situación económica de nuestro país y de otros en vías de desarrollo.

La detección de quistes de *Giardia* en agua negras es útil para determinar la prevalencia de la infección o para investigaciones epidemiológicas<sup>9</sup>. Estudios prospectivos deberán ser realizados para relacionar niveles de quistes en aguas negras de este y otros parásitos, infección y tasa de enfermedad. Esto es especialmente importante en nuestro país que presenta altos porcentajes de enteroparasitosis<sup>4,5,6</sup>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADAM, R.: The biology of *Giardia* spp. **Adv. Parasitol.** 1993;32: 72-133.
2. BEMRICK, W.; ERLANDSEN, S. Giardiasis - is it really a zoonosis?. **Parasitol. Today.** 1988;4:69-71
3. CERA, N.; CHAPMAN, C.; MORENO, E.; ROBERTIZ, M.: Microorganismos asociados a diarrea en niños menores de 5 años de edad en el Barrio Chino Julio de la ciudad de Maracaibo. **XXII Jornadas Venezolanas de Microbiología.** Mérida, Venezuela. 1994.
4. CHACIN-BONILLA, L.; RUBIO, F.; CUAMO, Y.; AÑEZ, S.: Prevalencia de *Entamoeba histolytica* y otros parásitos intestinales en una comunidad del Distrito Urdaneta, Edo. Zulia. **Invest. Clín.** 1984;25:11-24.
5. CHOURIO, G.; RINCON, W.; CASTELLANO, M.; LUZARDO, T.; MELEAN, C.: Prevalencia parasitaria en una comunidad sub-urbana del Distrito Maracaibo, Estado Zulia. **Kasmera.** 1988; 16: 30-47.
6. DIAZ, I.; CHOURIO, G.; ALVAREZ, M.; AÑEZ, O.; MORON, A.; ROMERO, E.: Prevalencia de parásitos intestinales en el Barrio Teotiste de Gallegos de la Ciudad de Maracaibo. Estado Zulia. **Kasmera.** 1992; 20:1-4.
7. GRASSMANN, L.; SCHWARTZROD, J.: Wastewater and *Giardia* cysts. **Wat. Sci. Tech.** 1991; 24: 183-186.
8. HIBLER, C.; HANCOK, C.: Waterborne Giardiasis. En: Gordon A. McFeters. Eds. **Water Drinking Microbiology.** New York-U.S.A, Springer-Verlag, 1990, p.271 -293.

9. JAKUBOWSKI, W.; SYKORA, J.; SORBER, C.; CASSON, L.; GAVAGHAN, P.: Determining giardiasis prevalence by examination of sewage. **Wat. Sci. Tech.** 1991;24:173-178.

10. MAHBUBANI, M.; BEJ, A.; PERLIN, M.; SCHAEFFER, F.; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R.: Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. **Appl. Environ. Microbiol.** 1991; 57: 3456-3461

11. NORTON, W.; LECHEVALLIER, M.; SIEGEL, J.; ABBASZADEGAN, M.: Evaluation of the IFA procedure for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* proposed for the ICR method. En: **Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology**. May 21 -25. 1995, Washington, DC

12. SEARS, S.; FERRECIO, C.; LEVINE, M.: Sensitivity of Moore sewer swabs for isolating *Salmonella typhi*. **Appl. Environ. Microbiol.** 1986; 51:425-426.

13. SHORE-GARCIA, L y ASH, L.: **Diagnóstico Parasitológico. Manual de Laboratorio Clínico**. 2a Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana 1983, p.157.

14 SMITH J.: *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **J. Food Protection**. 1993; 56: 451-461.

15 SYKORA, J.; SORBER, C.; JAKUBOWSKI, W.; CASSON, L.; GAVAGHAN, D.; SHAPIRO, M.; SCHOTT, M.: Distribution of *Giardia* cysts in wastewater. **Wat. Sci. Tech.** 1991; 24: 187-192.

16. SYKORA, J.: Analysis of water samples for protozoans. En: Gunther F. Craun Eds. **Methods for the Investigation and prevention of waterborne disease outbreaks**. U.S. Environmental Protection Agency. Publication No. EPA/600/1-90/005a. US Environmental Protection Agency, Cincinnati.

17. THOMPSON, R.; REYNOLDSON, J.; MENDIS, H.: *Giardia* and Giardiasis. **Adv. Parasitol.** 1993;32:72-133.

18. VESEY, G.; SLADE, J.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C.: A new method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.** 1993; 75:82-85.