

Nº 12
261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE
HUEVOS DE Ascaris sp. EN AGUAS POR
FILTRACIÓN EN MEMBRANA.

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N:

MIRIAM BERCOVICH ARECHIGA

ALFONSO HERNÁNDEZ GÓMEZ



México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| CAPITULOS | PAGINA | |
|-----------|---|----|
| 1 | INTRODUCCION. | 1 |
| 1.1 | GENERALIDADES. | 1 |
| 1.2 | ASCARIASIS. | 2 |
| 1.2.1 | Morfología. | 2 |
| 1.2.2 | Ciclo vital. | 2 |
| 1.2.3 | Mecanismos de transmisión. | 4 |
| 1.2.4 | Anatomía patológica y sintomatológica. | 5 |
| 1.3 | IMPORTANCIA SANITARIA. | 7 |
| 2 | JUSTIFICACION. | 10 |
| 3 | OBJETIVOS. | 11 |
| 4 | METODOS DE DETECCION DE PARASITOS EN EL AGUA. | 12 |
| 4.1 | METODOS DIRECTOS DE DETECCION DE PARASITOS. | 13 |
| 4.2 | CONCENTRACION Y METODOS AVANZADOS DE DETECCION DE PARASITOS EN EL AGUA. | 13 |
| 5 | DISEÑO EXPERIMENTAL. | 15 |
| 6 | METODOLOGIA. | 17 |
| 6.1 | FUNDAMENTO. | 17 |
| 6.2 | MATERIAL. | 17 |
| 6.3 | REACTIVOS. | 18 |
| 6.4 | PREPARACION DE LA MUESTRA. | 20 |
| 7 | RESULTADOS. | 23 |
| 8 | DISCUSION DE RESULTADOS. | 25 |

| | | |
|-----------|-------------------------|-----------|
| 9 | CONCLUSIONES. | 29 |
| 10 | RECOMENDACIONES. | 30 |
| 11 | BIBLIOGRAFIA. | 31 |

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES.

De estudios realizados recientemente ^{(1),(2)} se ha podido establecer que las parasitosis intestinales ocupan el tercer lugar como causa de morbilidad en la República Mexicana, y que además son responsables de un elevado índice de defunciones.

De las parasitosis intestinales la más frecuente en México es la amibiasis. Se ha calculado que en promedio el 27% de los mexicanos están afectados; en algunas poblaciones hasta el 86% de los individuos presentaron amibas en sus heces.

La giardiasis es otra parasitosis de las que se sabe que se presenta con elevada frecuencia en nuestro país, aunque no se tienen datos numéricos precisos, es la enfermedad producida por protozoarios más frecuente entre los niños debido a su ciclo biológico específico.⁽³⁾

En lo que respecta a las helmintiasis intestinales, en general se considera que al menos la mitad de la población mundial está infectada con una o más especies de helmintos; estas helmintiasis tienen mayor incidencia en zonas tropicales y comunidades pobres con bajos estándares de higiene.⁽⁴⁾ Se estima que la ascariasis es la helmintiasis intestinal más frecuente en la República Mexicana y que afecta a una tercera parte de la población.⁽⁵⁾

1.2 ASCARIASIS. ^{(4),(5),(6)}

La ascariasis es una enfermedad producida por el helmineto *Ascaris lumbricoides*, bastante común en nuestro medio, y cuyas características se detallan a continuación.

1.2.1 Morfología.

Este es un gusano redondo (nematelminto), blanco o rosado; el macho tiene una longitud de 10 a 31 cm y la hembra de 25 a 35 cm. Su cutícula es finamente estriada y lisa; sus extremidades anteriores y posteriores son cónicas y en el macho, la extremidad posterior es curvada.

Los huevos miden de 45 a 70 por 35 a 50 μm tienen una cubierta externa que sirve como barrera auxiliar contra la permeabilidad, pero puede faltar. Además tienen una parte gruesa transparente que actúa como estructura de sostén, y otra interna, vitelina, delicada, lipoidal y muy impermeable. Los huevos no fértiles miden de 88 a 94 por 39 a 44 μm , son más largos y estrechos que los fértiles, tienen una cubierta más delgada y otra irregular albuminosa, y están completamente llenos de una masa amorfa de protoplasma.

1.2.2 Ciclo vital.

Los gusanos adultos normalmente viven en el interior del intestino delgado. Obtienen su nutrición de la comida semidigerida

por el hospedero y de las células de la mucosa intestinal. Los gusanos macho o hembra se encuentran solos en personas muy ligeramente infectadas. Un gusano hembra tiene capacidad productora de 26×10^6 huevos, y en promedio ponen 200,000 diarios de los cuales cerca del 15% son fértiles⁽⁷⁾.

Los huevos no son segmentados cuando salen en las heces. En condiciones ambientales favorables, en el suelo, en tres semanas se forman embriones en segunda etapa infectante, después de la primera muda, dentro de la cubierta del huevo. La temperatura óptima para su desarrollo es de unos 25°C : variando de 21°C a 30°C . Las temperaturas inferiores retardan el desarrollo pero favorecen la supervivencia. A 37°C se desarrollan sólo hasta la etapa de 8 células. Como requieren oxígeno, su desarrollo se retarda en materiales putrefactos.

Los huevos infectantes después de ser ingeridos, se fijan en el intestino delgado proximal, liberando sus larvas rhabditoides (que miden de 200 a 300 por $14\mu\text{m}$) las cuales penetran la pared intestinal y llegan a las vénulas o linfáticos. Por la circulación porta pasan al hígado, de ahí a corazón y pulmones, y llegan a éstos unos siete días después de la infección. Ahí rompen los capilares y pasan a los alveolos. Eventualmente algunas larvas llegan al corazón izquierdo por las venas pulmonares y se distribuyen como émbolos en los diferentes órganos del cuerpo. En los pulmones las larvas sufren su segunda y tercera mudas. Emigran

o son transportadas de bronquiolos a bronquios, ascienden a tráquea y glotis y de ahí se degluten y llegan a esófago e intestino delgado. Durante el ciclo pulmonar aumentan cinco veces de tamaño, hasta 1.5 mm de longitud. Al llegar al intestino sufren una cuarta muda. Las hembras ovipositoras se desarrollan en unos dos meses después de la infección y viven de 12 a 18 meses⁽⁷⁾ (figura 1).

1.2.3 Mecanismos de transmisión⁽⁸⁾

La infección humana se adquiere mediante la ingestión de huevos embrionados, accidentalmente tomados del suelo contaminado, o bien mediante la ingestión de alimentos y bebidas contaminados con huevos embrionados viables; en los niños es muy frecuente la infección dados sus deficientes hábitos de higiene y su costumbre de jugar en el suelo —(Casi como los niños que comen estando sucios). En los trópicos todas las edades están masivamente parasitadas, en tanto que en los países subtropicales los niños están más infectados que los adultos y contaminan más a menudo el suelo. En países en los que las heces humanas se utilizan como fertilizantes de campos de cultivo y de huertas, la población adulta adquiere la infección al ingerir vegetales crudos contaminados con huevos totalmente embrionados; además el riego de cultivos con aguas residuales crudas o mal tratadas causa un incremento en la ascariasis tanto en consumidores como en trabajadores agrícolas⁽⁹⁾ (figura 2).

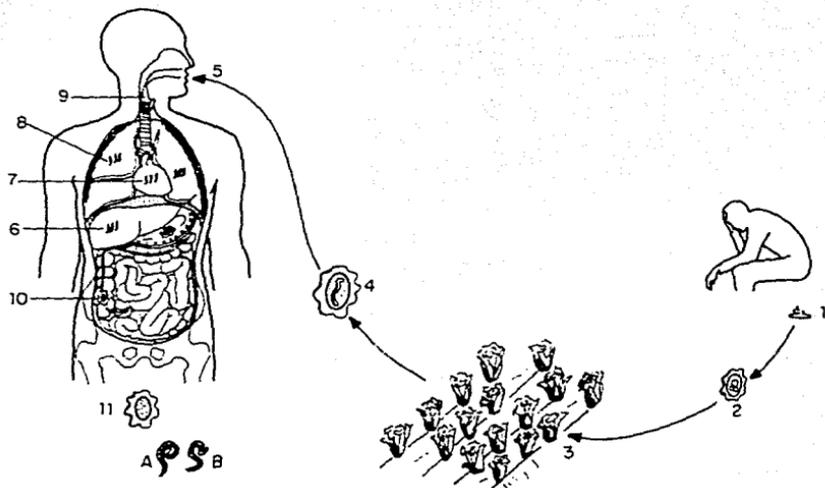


Fig 1

Ascaris lumbricoides, ciclo biológico: 1) Expulsión de -
 huevos con las materias fecales. 2) Huevos inmaduros de *A. lum-*
bricoides. 3) Contaminación del suelo, verduras, agua, alimen-
 tos, etc. 4) Huevo larvado infectante. 5) Ingestión de huevos
 infectantes. 6) Los huevos después de llegar al intestino del-
 gado, salen las larvas y llegan al hígado por vía hematológica.
 7) Llegada de larvas al corazón. 8) Paso de larvas por pulmo-
 nes. 9) Deglución de las larvas y llegada por segunda vez al -
 intestino. 10) Establecimiento de adultos en intestino. 11) Sa-
 lida de huevos al nuevo huésped; A) Adulto macho de *A. lumbric-*
oides. B) Adulto hembra de *A. lumbricoides*.

(Fuente: Tay-Lara-Velasco-Gutiérrez, 1990)

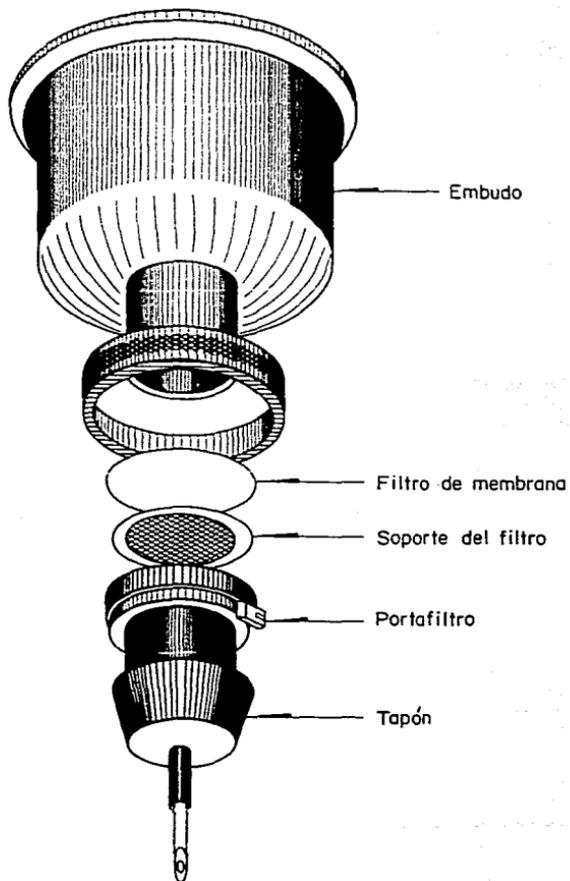


Fig 2 Ensamblaje del equipo para filtración por membrana

La ascariasis es esencialmente una infección de las casas y sus patios, propagada, sobre todo, por la infestación del suelo que rodea la casa con los huevos de las evacuaciones intestinales de los niños pequeños, los que a su vez se reinfectan con los huevos que recogen con los dedos e introducen a la boca.

El hospedero de *A. lumbricoides* es el hombre. Los cerdos y los perros pueden dispersar los huevos no desarrollados de *A. lumbricoides* ingiriéndolos en las heces humanas y excretándolos posteriormente en otros lugares.⁽⁷⁾

1.2.4 Anatomía patológica y sintomatología.

La infección usual la origina la presencia de 10 a 20 gusanos, a menudo pasa inadvertida para el hospedero y sólo se descubre en estudios sistemáticos de materias fecales o por la observación de un gusano adulto expulsado espontáneamente en las heces.

El síntoma más frecuente de los pacientes infectados por *Ascaris* es dolor abdominal vago. Durante la migración pulmonar las larvas llegan a producir sensibilización del hospedero, lo que provoca manifestaciones alérgicas como infiltración pulmonar, ataques asmáticos y edema de labios. Si son muchas las larvas que emigran a la vez, pueden provocar neumonía hemorrágica intensa. Se han descrito encefalitis y meningitis en pacientes infectados por *Ascaris*, lo que sugiere que las larvas migratorias pueden

llegar al encéfalo.

Los efectos graves, a veces fatales, de la ascariasis se deben a la migración de los gusanos adultos, que pueden ser regurgitados y vomitados, escapar a través de las narinas o rara vez, ser inhalados por un bronquio. Se han descrito muchos casos de invasión de vías biliares, vesícula, hígado y apéndice. Pueden causar pancreatitis hemorrágica aguda o bien transportan bacterias intestinales a estos sitios, originando abscesos. También pueden producir peritonitis y obstrucción intestinal.

Aun cuando los gusanos causen daños escasos o nulos, sus productos pueden provocar notables manifestaciones tóxicas en personas sensibilizadas, como edema facial y urticaria gigante acompañada de insomnio, pérdida de apetito y de peso. Esta acción puede deberse a que los alimentos son consumidos por los gusanos, o a la sustancia inhibidora de la tripsina que estos producen que interfiere con la digestión de proteínas del hospedero. Se ha demostrado que 20 gusanos adultos consumen 2.8 g de carbohidratos y 0.7 g de proteínas diariamente; de ahí que en las infecciones intensas, en las que los hay por cientos, consuman una proporción importante de los alimentos del hospedero.

Por lo general, el pronóstico es favorable y la infección responde fácilmente al tratamiento. Es grave en enteritis aguda y obstrucción intestinal en niños pequeños, o cuando el parásito

adulto ha invadido órganos vitales.

1.3. IMPORTANCIA SANITARIA.

Aunque se ha determinado que el factor principal de contagio de helmintiasis son los hábitos deficientes de higiene, no deja de ser importante el papel que desempeña el agua como vehículo de transmisión, sobre todo si no recibe tratamiento o éste es deficiente para adecuarla al consumo humano.⁽¹⁰⁾ Se ha demostrado que algunas deficiencias en el tratamiento de las aguas fueron responsables de muchas epidemias⁽¹¹⁾. Por ejemplo: Denver en 1971, Las Vegas en 1973 y Roma en 1974.

Por otra parte, en otros estudios se ha reportado que las bacterias coliformes fecales y totales no son adecuadas para determinar la calidad del agua para consumo humano⁽¹¹⁾; este hecho lo confirman reportes de epidemias en donde se aislaron organismos patógenos (bacterias, protozoarios, helmintos) a partir de aguas que cumplían con los estándares para organismos coliformes fecales y totales^{(11),(12)}; así, por ejemplo, en estudios realizados en México⁽¹⁰⁾ se identificaron huevos de helmintos de los géneros *Ascaris* y *Trichuris* y helmintos adultos de vida libre (los cuales presentan gran resistencia al cloro libre⁽¹²⁾); además se ha demostrado que dos especies (*Cheilobus quadrilabiatus* y *Diplogaster nudicapitatus*) de la familia Rhabditidae, aislados de aguas tratadas, son capaces de ingerir bacterias patógenas como *Salmonella* y *Shigella*, y virus entéricos como Coxsackie, lo que

los hace portadores potenciales de enfermedades gastrointestinales.

Otra característica de estos helmintos de vida libre es que pueden conferir mal olor y sabor al agua. ⁽¹²⁾

Entre las helmintiasis más comunes en el país, figura la ascariasis. *Ascaris lumbricoides* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial debido a que presenta gran resistencia a los diferentes medios ambientales; entre sus características figuran las siguientes:

Los huevos de *Ascaris* pueden sobrevivir en condiciones ambientales variables por largos periodos, de meses a años. ⁽⁷⁾ Pueden permanecer viables en condiciones anaerobias por largo tiempo.

Algunos experimentos han revelado que los huevos de *Ascaris* pueden sobrevivir hasta 15 meses en ríos y aproximadamente 2 días en el mar.

El cloro y las cloraminas, a las concentraciones y tiempos de contacto usados durante el tratamiento del agua, son completamente ineficaces contra los huevos de *Ascaris*.

Los huevos pueden sobrevivir aproximadamente un año en heces y desechos de letrinas. En condiciones anaerobias el desarrollo se detiene pero se reinicia cuando se introduce aire.

En el suelo pueden sobrevivir varios años, el máximo registro de tiempo de sobrevivencia es de 7 años.⁽⁴⁴⁾

Por otra parte, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, en su título tercero, capítulo I, artículo 210 establece que para considerar el agua como potable, el número de organismos coliformes totales deberá ser, como máximo, de dos y además no contendrá organismos fecales; las únicas metodologías de que se dispone para el análisis del agua para consumo humano son las técnicas de filtración en membrana y la del número más probable (NMP), las cuales se refieren a la determinación de bacterias coliformes fecales y coliformes totales, las cuales no son suficientes para evaluar con precisión la calidad microbiológica del agua, y cuya ausencia en ellas no implica necesariamente la ausencia de bacterias patógenas, parásitos intestinales y virus que son los agentes etiológicos de las enfermedades gastrointestinales.

2. JUSTIFICACION

Se considera que al menos la mitad de la población en México se encuentra infectada con una o más especies de helmintos. Tomando en cuenta la resistencia que tienen ciertos huevos de parásitos al tiempo y dosis de cloración al que se someten normalmente en plantas de tratamiento de aguas, hace muy importante su detección al final de dicho tratamiento.

También el hecho de que se utilice agua de primer uso para el riego de cultivos, hace importante tener una técnica para la detección y cuantificación de huevos de parásitos.

Además, debido a que no hay técnicas para la detección de huevos de parásitos en agua de consumo humano, que consideren los requerimientos del país y que pueda implantarse como una técnica de rutina, se justifica la realización del presente trabajo, para el cual se plantean los siguientes objetivos.

3. OBJETIVOS

Ensayar y validar una técnica propuesta para la detección de huevos de *Ascaris sp.* en agua de consumo humano, que sea de fácil manipulación, que se pueda realizar en un laboratorio ordinario, de bajo costo y con alta eficiencia.

Proponer esta técnica como una herramienta para evaluar la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano.

4. METODOS DE DETECCION DE PARASITOS EN EL AGUA.

La mayoría de los métodos usan una o más de las características de los huevecillos o quistes, su peso relativamente alto y su tamaño comparado con otros microorganismos como bacterias o virus, para su aislamiento del agua.

Los métodos de aislamiento más sencillos utilizan la sedimentación de huevecillos grandes como los de helmintos; la centrifugación se utiliza también para huevos y quistes pequeños (como los de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*) que no sedimentan fácilmente.

La ventaja de usar métodos sencillos es el requerir equipo sencillo, su desventaja es que son imprácticos para procesar volúmenes grandes de agua.

Los métodos de concentración que utilizan membranas o filtros tienen la ventaja de poder procesar volúmenes grandes (1000 a 2000 litros con filtros de estambre), pero tienen la desventaja de utilizar material y aparatos más sofisticados, lo cual incrementa el costo y los hace de difícil manipulación.

Los métodos dirigidos a limpiar las muestras sedimentadas o concentradas de material foráneo, que aprovechan la densidad específica de los parásitos son llamados de flotación; son relativamente sencillos e incrementan la eficiencia de la

detección.

4.1 METODOS DIRECTOS DE DETECCION DE PARASITOS

Se llaman métodos directos debido a que los procedimientos de concentración son muy sencillos y la identificación de parásitos se realiza por observación directa al microscopio. Estos métodos se aplican para examinar aguas limpias o con bajo contenido de material foráneo o basura, ya que éste puede ser eliminado por medio de extracciones con éter.

Los métodos de concentración utilizados pueden ser: flotación, centrifugación y filtración por membrana.

La observación directa al microscopio se puede realizar en una cámara de conteo, en cubreobjetos o en membranas clarificadas.

4.2 CONCENTRACION Y METODOS AVANZADOS DE DETECCION DE PARASITOS EN EL AGUA. (10,17).

Estos métodos se basan en hacer una concentración de volúmenes grandes de agua por medio de una filtración *in situ*, a través de filtros especiales (de los cuales hay una gran variedad) de cartucho de estambre, con poros de $1.0 \mu\text{m}$ que tienen la capacidad de filtrar el volumen deseado. Los parásitos de interés son atrapados en el filtro debido a que son más grandes que los poros y después pueden ser removidos de las fibras del filtro y procesados en el laboratorio.

Es necesario el uso de mangueras y bombas para poder realizar la toma de muestras del volumen deseado, y pasarlos a través de filtros.

Una vez realizado este proceso se eluyen los parásitos retenidos en el filtro por medio de un retrolavado y la desmenuzación de las fibras en una solución diluida de detergente tween 80; posteriormente el eluato se concentra por centrifugación y despues por flotación; finalmente se hace la detección de huevos o quistes de parásitos por medio de métodos de inmunofluorescencia directa e indirecta.

Es importante mencionar que el mantenimiento adecuado de todo el material que se utiliza es laborioso y consume mucho tiempo.

Por otra parte, bajo ninguna circunstancia el equipo puede ser usado para tomar muestras de aguas negras y después de agua potable o considerada muy limpia. Se debe utilizar equipo separado para este tipo de muestras.

De entre los métodos mencionados se eligió el de concentración por filtración en membrana combinado con el de observación directa en membrana clarificada, ya que con éstos se disminuye la manipulación de la muestra, el equipo y los materiales que se requieren pueden adquirirse en el país.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Dado que se pretendían establecer las condiciones idóneas que debía reunir el procedimiento analítico seleccionado, se eligieron como factores de prueba el volumen de la muestra, el número de huevos que contiene y el diámetro de poro de la membrana filtrante, lo cual determinó que se planteara un diseño experimental factorial, en el cual se incluyeron los siguientes niveles de prueba de cada uno de los factores anteriores: en volumen se escogieron tres niveles que corresponden a 2, 5 y 10 litros; en número de huevos, dos niveles de 14 y 36 huevos; en diámetro de poro de la membrana, cuatro niveles de 0.45, 3.0, 5.0 y 8.0 μm .

Estos tres factores se combinaron con todos sus niveles para dar un total de $3 \times 2 \times 4 = 24$ experimentos con una repetición, lo que resulta en un total de 48 experimentos. Esta información se resume en el cuadro siguiente :

| FACTOR | NIVEL | | | |
|---|-------|----|----|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Volumen de muestra en litros (V) | 2 | 5 | 10 | - |
| Número de huevos, en promedio (C) | 14 | 36 | - | - |
| Tamaño de poro de membrana en μm (P) | .45 | 3 | 5 | 8 |

Se planteó la hipótesis nula, H_0 , de que ningún factor en cualquiera de sus niveles afecta en el porcentaje de eficiencia de la técnica propuesta.

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de varianza para determinar las interacciones de los factores y sus niveles, y su influencia en la eficiencia de la técnica.

6. METODOLOGIA.

6.1 FUNDAMENTO.

La técnica se basa en la concentración de la muestra por filtración a través de una membrana de ésteres de celulosa con poros de 0.45, 3, 5, y 8 μm de diámetro, aplicando vacío de 40 cm Hg. Los organismos adheridos al filtro se recuperan en solución salina isotónica; esta suspensión se filtra en un swinex, a través de una membrana con poros de 0.22 μm de diámetro; se le da un tratamiento de deshidratación y aclaración⁽⁴⁵⁾, para proceder a su observación microscópica con objetivos de 10 y 40 x.

6.2 EQUIPO Y MATERIAL

- Equipo para filtración Millipore
- Equipo swinex para filtración Millipore
- Membranas para filtración Millipore de 0.45, 3, 5 y 8 μm (47mm de diámetro) y de 0.22 μm (25mm de diámetro).
- Microscopio óptico
- Estufa.
- Balanza
- Espátula
- Asa bacteriológica calibrada 1/300, 1/1000.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Garrafrones de plástico de 2, 5, y 10 litros.
- Equipo y material necesario para preparar y almacenar los reactivos.

6.3 REACTIVOS.

1) Solución de yodo de D'Antoni:

| | |
|---------------------------------|----------|
| Yoduro de potasio(KI) | 1.0g |
| Yodo en polvo (I ₂) | 1.5g |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Disolver con agitación, vaciar la solución a un frasco de vidrio color ámbar y dejarla en reposo durante cuatro días antes de usarla. Esta solución es estable por seis meses.

2) Solución salina isotónica (SSI)

| | |
|-------------------------|--------|
| Cloruro de sodio (NaCl) | 8.5g |
| Agua destilada | 1000ml |

Disolver con agitación. Almacenar en un frasco de vidrio o de plástico bien tapado. La solución es estable por tiempo indefinido.

3) Glicerol.

4) Etanol al 10%

| | |
|-----------------|-------|
| Etanol absoluto | 10 ml |
| Agua destilada | 90 ml |

5) Etanol al 20%

| | |
|-----------------|-------|
| Etanol absoluto | 20 ml |
| Agua destilada | 80 ml |

- 6) Etanol al 40%
- | | |
|-----------------|-------|
| Etanol absoluto | 40 ml |
| Agua destilada | 60 ml |
- 7) Etanol al 80%
- | | |
|-----------------|-------|
| Etanol absoluto | 80 ml |
| Agua destilada | 20 ml |
- 8) Etanol al 95%
- | | |
|-----------------|-------|
| Etanol absoluto | 95 ml |
| Agua destilada | 5 ml |
- 9) Suspensión de huevos de *Ascaris summ* en formol 0.4%
- Hembras grávidas de *Ascaris summ* 1 ó 2
- | | |
|-------------------------|--------|
| Solución de formol 0.4% | 100 ml |
|-------------------------|--------|
- Disecionar las hembras longitudinalmente utilizando pinzas y tijeras. Con las pinzas extraer todos los órganos internos y colocarlos en un mortero.
- Añadir unos mililitros de solución salina isotónica (0.85%) y moler con el pistilo, de manera de hacer una suspensión; pasarla por un colador.
- Recibir la suspensión en un frasco de vidrio perfectamente limpio.
- Añadir a esta suspensión unos 100 ml del formol.

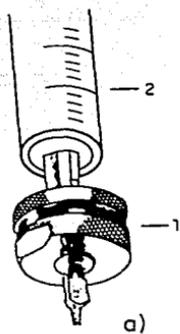
6.4 PREPARACION DE LA MUESTRA (EVALUACION DE LA TECNICA)

- 1) Homogenizar la suspensión de huevos de *Ascaris suum* y tomar una asada (asa de 1/1000 ó 1/300); colocarla en un portaobjetos y adicionar una gota de solución salina isotónica, tapar con un cubreobjetos y contar al microscopio el número de huevos (con asa de 1/1000 se toman en promedio 14 huevos/asada y con asa de 1/300 36 huevos/asada).
- 2) Lavar el contenido del portaobjetos (huevos) con todo y cubreobjetos en un vaso de precipitados de 50 ml con solución salina isotónica, pasar cuantitativamente los lavados al garrafón de 2, 5 ó 10 litros que contiene el volumen apropiado de solución salina isotónica; agitar el garrafón para homogenizar la muestra.

6.5 PROCEDIMIENTO.

- 1) Montar el equipo de filtración como se indica en la figura 2, teniendo cuidado de usar fórceps para colocar las membranas; éstas deberán tener poros de 0.45, 3.0, 5.0, u 8.0 μm de diámetro, según sea el caso.
No es necesario esterilizar el embudo de filtración, únicamente lavarlo y enjuagarlo con agua destilada.
- 2) Agitar fuertemente la muestra para favorecer el desprendimiento de los organismos que pudieran estar adheridos a las paredes internas del garrafón.

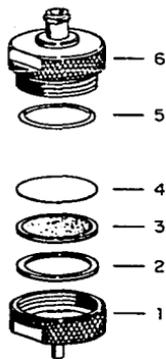
- 3) Filtrar la muestra aplicando vacío máximo de 40 cm Hg; una presión mayor podría destruir a los organismos. Al terminar la filtración lavar las paredes del recipiente de muestreo y del embudo con solución salina isotónica, para arrastrar hacia el filtro los organismos adheridos a ellas. Desconectar el vacío, retirar el embudo y levantar la membrana con los fórceps.
- 4) Colocar la membrana sobre la pared de un vaso de precipitados, rasparla cuidadosamente con una espátula y después, utilizando una pizeta, lavar la membrana y la espátula con solución salina isotónica, recibiendo los lavados en el mismo vaso.
- 5) Pasar cuantitativamente este concentrado a través de una membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro, usando una jeringa de 50 ml y equipo de filtración swinex, aplicando poca presión (figura 3).
- 6) Añadir al filtro una cantidad suficiente (2 ml) de solución de yodo de D'Antoni y filtrar lentamente.
- 7) Deshidratar la membrana con porciones de etanol (2 ml) al 10, 20, 40, 80 y 95 % Dejar que el último enjuague de etanol se evapore completamente.
- 8) En un portaobjetos colocar una gota de glicerol y encima la membrana, añadir otra gota de glicerol, pasar el



1 Filtro Swinex

2 Jeringa

a)



1 Base de acero inoxidable, Salida Luer

2 Anillo de teflón

3 Soporte del filtro

4 Filtro de membrana (25 mm ϕ)

5 Anillo de teflón

6 Entrada Luer, de acero inoxidable

b)

Fig 3 Equipo Swinex para filtración

portaobjetos a la estufa a 37 °C y esperar a que la membrana se transparente.

9) Colocar la preparación en la platina del microscopio y observarla con los objetivos de 10 y 40 x

10) Contar los huevos y reportar porcentaje de eficiencia:

$$\% \text{ eficiencia} = \frac{\text{Número huevos encontrados}}{\text{Número huevos colocados}} \times 100$$

7. RESULTADOS

Los resultados de los cuarenta y ocho experimentos se agrupan en el cuadro número 2. En el cuadro 3 se muestran los resultados del análisis de varianza.

CUADRO NUM. 2. ARREGLOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS

| NIVEL DEL FACTOR | | | % EFICIENCIA | |
|------------------|---|---|--------------|------|
| V | C | P | | |
| 1 | 1 | 1 | 85.7 | 83.3 |
| 1 | 2 | 1 | 71.9 | 70.0 |
| 1 | 1 | 2 | 83.3 | 88.9 |
| 1 | 2 | 2 | 73.3 | 87.2 |
| 1 | 1 | 3 | 80.0 | 88.9 |
| 1 | 2 | 3 | 77.5 | 78.0 |
| 1 | 1 | 4 | 71.4 | 71.4 |
| 1 | 2 | 4 | 83.0 | 80.0 |
| 2 | 1 | 1 | 84.8 | 82.5 |
| 2 | 2 | 1 | 84.8 | 82.2 |
| 2 | 1 | 2 | 72.7 | 81.3 |
| 2 | 2 | 2 | 84.8 | 77.5 |
| 2 | 1 | 3 | 73.3 | 77.8 |
| 2 | 2 | 3 | 74.5 | 89.0 |
| 2 | 1 | 3 | 98.8 | 75.4 |
| 2 | 2 | 4 | 90.3 | 82.5 |
| 3 | 1 | 1 | 86.7 | 80.0 |
| 3 | 2 | 1 | 78.7 | 86.5 |
| 3 | 1 | 2 | 58.8 | 73.0 |
| 3 | 2 | 2 | 48.9 | 87.5 |
| 3 | 1 | 3 | 86.7 | 70.0 |
| 3 | 2 | 3 | 78.0 | 85.8 |
| 3 | 1 | 4 | 85.7 | 88.4 |
| 3 | 2 | 4 | 75.9 | 86.2 |

CUADRO NUM. 3

ANALISIS DE VARIANZA

| FUENTE | GL | SS | MS | | F _o | F _r |
|--------|----|---------|---------|-------------------------------------|----------------|----------------|
| | | | (MS/GL) | (MS _F /MS _E) | | |
| TRAT | 23 | 1639.30 | 71.27 | 0.71 | 1.98 | |
| V | 2 | 188.50 | 93.25 | 0.93 | 3.40 | |
| P | 3 | 191.35 | 63.78 | 0.64 | 3.01 | |
| C | 1 | 5.88 | 5.88 | 0.06 | 4.26 | |
| VP | 6 | 591.93 | 98.66 | 0.99 | 2.51 | |
| VC | 2 | 82.23 | 41.12 | 0.41 | 3.40 | |
| PC | 3 | 254.08 | 84.69 | 0.85 | 3.01 | |
| VPC | 6 | 327.32 | 54.55 | 0.55 | 2.51 | |
| ERROR | 24 | 2393.74 | 99.74 | | | |
| TOTAL | 47 | 4033.04 | | | | |

Este análisis se realizó utilizando un paquete estadístico elaborado por Hernando E. Mutis G. del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS) de la UNAM.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

El porcentaje promedio de eficiencia para el factor C (número de huevos) es de 77.6 % en su nivel de 13 huevos y de 76.9 % para 36 huevos; por lo tanto la eficiencia promedio de la técnica es de 77.3 % . Además se observa que existe reproducibilidad en los resultados.

De la tabla de análisis de varianza se observa que ningún factor en ninguna de sus combinaciones en todos sus niveles afecta la eficiencia de la técnica, ya que en todos los casos la F experimental es menor que la F de tablas (para un nivel de significancia de 95 %), esto implica, que la eficiencia de la técnica no cambia cuando se utiliza cualquier combinación de factores.

De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió seleccionar 10 litros como volumen estandar de muestra, dado que, como la población de microorganismos no está homogéneamente distribuida en un agua natural, es más factible que puedan detectarse los nemátodos en este volumen, que en 2 ó 5 litros, además de que representa mayor seguridad para el consumidor el que no se detecten parásitos en 10 litros de muestra que en volúmenes menores.

En cuanto al tamaño de poro de la membrana filtrante, lo recomendable sería escoger el de 8 μ m, dado que proporciona la

mayor velocidad de filtración, y por lo tanto se requiere menor tiempo para el análisis, sin embargo, si se desea detectar la presencia, no sólo de huevos de nemátodos, sino también de quistes de protozoarios, y dado que los quistes de *Giardia lamblia* miden de 8-12 por 7-10 μm y los de *Entamoeba histolytica* miden de 10 a 20 μm , entonces, para asegurar la retención de los quistes de ambos protozoarios, se recomienda usar la membrana con poros de 5 μm .

8.1 APLICACION DE LA TECNICA A MUESTRAS NATURALES.

Se aplicó la técnica a una serie de muestras naturales de diferentes fuentes y lugares para detectar interferencias y/o problemas que pudieran presentarse a través de su manejo rutinario. El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron 10 litros de muestra en un garrafón de plástico perfectamente limpio y enjuagado con agua destilada (no se requieren condiciones estériles). Cuando se trató de muestras de cisternas o tinacos, se sumergió y se dejó llenar a su capacidad; cuando se trató de muestras de grifos, se abrió la llave y se dejó correr el agua libremente durante uno a dos minutos, después se llenó el garrafón a su capacidad. Los recipientes se taparon y transportaron al laboratorio, y las muestras se analizaron dentro de las 24 h posteriores al muestreo.

Se siguieron los pasos 1 al 3 del procedimiento, y se observó

que cuando las muestras presentaban turbiedad o sedimento, éstos provocaban el taponamiento de los poros de la membrana, lo que impedía la observación directa; para tratar de eliminar esta interferencia, se aplicó la siguiente variación al procedimiento:

a) Preparar la siguiente solución:

Sulfato de zinc $\rho = 1.18$

Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 331 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver con agitación. Comprobar la densidad con un hidrómetro o pesando un volumen de solución. Almacenar en frasco color ámbar de vidrio. La solución es estable por más de seis meses.

b) Seguir pasos 1 - 3

c) En el paso 4 lavar la membrana y la espátula con sulfato de zinc $\rho = 1.18$ recibiendo los lavados en el mismo vaso.

d) Pasar cuantitativamente el concentrado a tubos de centrífuga y centrifugar a 2300 rpm por 3 minutos.

e) Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitados.

f) Resuspender el sedimento con una porción pequeña de $ZnSO_4 \rho = 1.18$ y centrifugar a 2300 rpm por 3 minutos.

g) Repetir el paso e)

- h) El sobrenadante concentrado (pasos d) y f)) filtrarlo a través de un swinex con membrana de 25mm de diámetro y poros con diámetro de 0.22 μ m usando jeringa y aplicando poca presión
- i) Continuar con los paso 8 - 9
- j) Reportar número de huevos/10 l de muestra.
Con este pretratamiento sí se logró la observación de las estructuras parasitarias, aunque se desconoce su eficiencia, ya que el procedimiento no fue validado por estar fuera de los alcances de éste estudio.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que el volumen ideal de muestra es de 10 l y que deben concentrarse por filtración en membrana de 5µm.

- No es recomendable analizar volúmenes mayores debido a que esto implica una manipulación excesiva de la muestra (con la consecuente disminución de la eficiencia) debido a las limitaciones del equipo empleado (equipo Millipore).

- Cuando la muestra presente turbiedad o sedimento no se podrá aplicar la técnica directa.

Esta técnica tiene un bajo costo y un tiempo de análisis de 45-60 minutos, con una eficiencia de 77.3% por lo que puede ser adoptada por la mayoría de los laboratorios de empresas públicas que se encargan de determinar la calidad del agua potable.

10. RECOMENDACIONES

- En tanto no se valide la eficiencia del pretratamiento, no se recomienda el uso de esta técnica para el análisis de aguas turbias.

- La técnica debe ser aplicada por personal capacitado y con experiencia en la identificación de las estructuras parasitarias.

11. BIBLIOGRAFIA.

1. GACETA UNAM 1(49):22, 19 de julio de 1982
2. IMSS, Boletín epidemiológico, 1989
3. SHEPHARD, M. R. (1978). "Helminthological Aspects of Sewage Treatment in Hot Climates". In: Water, wastes and health in hot climates. R. Feachen, M. Mc Garry and D. Mara, Eds., Jhon Wiley and Sons, New York pp. 299-310.310.
4. BROWN, H. W. , Belding, D. L. "Parasitología Clínica", cap. 6 pp 121-125. 2a. ed. Edit. Interamericana, México 1968.
5. CHANDLER, A. C. , Read, P. C. "Introducción a la Parasitología". cap 20, pp 468-477. Ediciones Omega, Barcelona 1965.
6. TAY, Z. J. , Velazco, C. O. "Parasitología Médica". cap. XIX pp. 301. 4a. ed. Méndez Cervantes Editores, México, 1989.
7. D.D.F. , D.G.C.O.H. Ascaris y Ascariasis. Informe técnico de circulación restringida pp. 375-393.
8. FAUST, C. E. , Russell, F. P. "Parasitología Clínica". cap. 21 pp. 339. 8a. ed. Edit. Salvat, Barcelona, 1988.
9. ORTA, L. T. , Galván, G. M. , Flores, T. R. C. , Castillo, H. Z. , Miranda, F. , Diaz, A. N. "Determinación del uso del suelo como medio de tratamiento". Instituto de Ingeniería UNAM, 1989.
10. GALVAN, G. M. "Diagnóstico de la calidad de agua de consumo humano". Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 1987.

11. DUTKA, B. J. "Coliforms are an Inadequate Index of Water Quality. Journal of Environmental Health". 36 : 39-46, 1973.
12. CHANG, S. L. "Viruses, Amebas and Nematodes and Public Water Supplies". Journal American Water Works Association. 53 : 288-296, 1981.
13. CRAUN, G. F. , Mc. Cabe, L. J. "Waterborne Disease Outbreaks in the US 1971-1974". Journal American Water Works Association. 68 : 420-424, 1976.
14. KOZLOVA, M . V. "Treating Sewage Deposits at Filter Stations against Helminths". Part I, 117-120. 1985.
15. YATES, M. V. , Gerba, C. P. "Virus Persistence in Groundwater". Applied and Environmental Microbiology. 49:778-781, 1985.
16. IMTA, OMS/OPS, D.D.F./DGCOH, "Apuntes sobre el Curso Internacional de Virología y Parasitología de Aguas". México,D.F. 26 septiembre-7 octubre 1988.
17. HAUSLER, W. J. , Davis, W. E. "Development and Testing of a Filter System for Isolation of Giardia lamblia Cysts from water". Applied and Environmental Microbiology. 47 : 1346-1347, 1984.
18. GALVAN, G. M. "Técnica para la identificación y cuantificación de parásitos intestinales en agua potable" (tentativa). INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA.