

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**“DETECCIÓN DE *Giardia* spp. Y *Cryptosporidium* spp., ASOCIADOS A
Clostridium perfringens EN LA POTABILIZADORA JAIME DÍAZ QUINTERO
DE LA CHORRERA”.**

ELABORADO POR:
JULIETTE MARIE PADILLA ORTEGA

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025.

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis primeramente a Dios, a mis padres, hermanas, abuelos, abuelas, a mi esposo y sobre todo a mí, por ser perseverante y a pesar de las dificultades levantarme y poder seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por guiarme y sostenerme a lo largo de este camino. A mis padres y abuela por su amor y apoyo incansable, a ustedes les dedico este logro. También quiero agradecer a mi esposo, por su amor, apoyo y comprensión durante la culminación de esta etapa de mi carrera.

Me gustaría agradecer a la institución que me abrió las puertas para realizar mi trabajo de investigación, el Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacional (IDAAN), en especial a la Licenciada Blanca Marciaga, a todos los colaboradores del departamento de Control de Calidad de Corozal y a los colaboradores de la planta Jaime Díaz Quintero de la Chorrera por hacerme parte de su equipo y por su entera disposición durante este proyecto.

Un sincero agradecimiento a mis amigas y compañeras por su amistad y apoyo durante todos estos años como estudiantes de Licenciatura en Biología, Ana Cristina Ortega, Danelys Valdés, Maythé Murillo y a mi amigo y compañero Joel Herrera.

Finalmente agradezco la guía y colaboración de mis profesores asesores en la revisión de mi trabajo a la profesora Nivia J. Ríos, a la profesora Nidia R. Sandoval, al profesor Fermín Mejía y a la Licenciada Delba Villalobos por su apoyo en el análisis estadístico de los datos obtenidos durante la parte experimental.

Gracias a todos por ser parte de este proceso tan importante para mí lleno de aprendizaje, retos y nuevas metas por alcanzar.

ÍNDICE

ÍNDICE

Contenido

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE.....	VI
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
Justificación.....	6
Definición del problema.....	8
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	9
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Hipótesis.....	10
CAPÍTULO I.....	11
MARCO TEÓRICO.....	11
1.1. Antecedentes históricos de <i>Giardia</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp.....	12
1.2. Descripción general de los parásitos.....	13
1.3. Epidemiología.....	14
1.3.1. Efectos de <i>Giardia</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp. sobre la salud humana.....	14
1.4. Fuente de propagación.....	15
1.5. Vías de exposición.....	15
1.5.1. Ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp.....	16
1.5.2. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	17
1.6. Importancia de la presencia de <i>Giardia</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp. en agua de consumo humano.....	18
1.7. Técnicas de análisis de agua empleadas para la detección de protozoos entéricos:	
19	

1.7.1.	Métodos de detección de los quistes de <i>Giardia</i> y ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> en agua de consumo humano.....	19
1.7.1.1.	Métodos inmunológicos	19
1.7.1.2.	Microscopía de inmunofluorescencia directa (dIFM)	20
1.7.1.3.	Método EPA 1623.1 2012: <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en agua por filtración/IMS/FA	21
1.7.1.3.1.	Ventajas y Desventajas	22
1.7.1.4.	Ensayos Moleculares	23
1.7.1.4.1.	Ventajas y Desventajas	23
1.7.5.	Detección <i>Clostridium perfringens</i> en agua para consumo humano.....	24
1.7.5.1.	Técnicas de análisis de agua empleadas para la detección de <i>Clostridium perfringens</i> :25	
1.7.5.1.1.	Método de filtración sobre membrana: Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i> . 25	
1.8.	Estudios relacionados a la detección en agua de <i>Giardia</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp. en Panamá.	25
1.9.	Características del sitio de estudio.....	26
1.9.1.	Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero	26
1.9.2.	Río Caimito	27
1.9.3.	Clima	27
1.9.4.	Procesos de Tratamiento utilizados por la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero	29
1.10.	<i>Clostridium perfringens</i> como posible indicador de la presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	31
1.11.	Importancia de <i>C. perfringens</i> en el agua para consumo humano.....	33
	CAPÍTULO II.....	34
	METODOLOGÍA.....	34
2.1.	Descripción del Sitio de Estudio	35
2.1.1.	Descripción de puntos de muestreo	35

2.2.	Colecta de las muestras.....	35
2.2.1.	Volumen de muestras para <i>Giardia</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp.	36
2.2.2.	Volumen de muestras para <i>Clostridium perfringens</i>	36
2.3.	Cadena de Almacenamiento y Transporte.....	36
2.4.	Determinación de <i>Giardia</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp. en agua por la técnica de filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. De la EPA. MÉTODO ESTÁNDAR. EDICIÓN 23/ 9711 B.	36
2.4.1.	Criterios de Aceptación	37
2.4.2.	Concentración inicial de la muestra.....	37
2.4.3.	Tiempo máximo admisible para el procesamiento de la muestra en cada paso. 38	
2.4.4.	Dispersión de la muestra.....	38
2.4.5.	Elución.....	39
2.5.	Detección de <i>Clostridium perfringens</i> por el método ISO 14189:2013	46
2.5.1.	Preparación de materiales.....	46
2.5.1.1.	Preparación de medios de cultivo.....	46
2.5.2.	Procedimiento: Filtración por membrana	47
CAPÍTULO III		49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		49
CAPÍTULO IV		63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		63
BIBLIOGRAFÍA		66
ANEXOS.....		74

RESUMEN

Los protozoos como *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. pueden provocar infecciones asintomáticas y graves, en adultos y niños. Los quistes de *Giardia* spp. y los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. generalmente pueden transportarse a través del agua y también son resistentes al medio ambiente. Por lo tanto, en esta investigación se buscó determinar la asociación entre estos parásitos y un indicador. Los indicadores deben cumplir con ciertas características, como estar universalmente presentes en un gran número de muestras de materia fecal humana y de animales de sangre caliente, ser fáciles de detectar mediante métodos sencillos y no desarrollarse en el agua bajo condiciones naturales. Por esta razón, se seleccionó la bacteria *Clostridium perfringens*. Para los parásitos de interés en salud pública es necesario realizar una determinación precisa de la presencia de quistes y ooquistes, por lo tanto, se requiere un método confiable para la detección y enumeración de estos organismos patógenos. La detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. se realizó mediante la técnica de análisis por filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. de la EPA, obteniendo muestras positivas de ambos parásitos en agua sedimentada y cruda, sin embargo, las muestras para agua potable se mantuvieron negativas durante ambas épocas del año y también se pudo determinar la viabilidad de los de los quistes y ooquistes mediante ensayos de inmunofluorescencia incluidos como parte de esta técnica. Por otra parte, se utilizó el método 14189:2013 para la enumeración de *Clostridium perfringens* de la Norma ISO para determinar la asociación entre esta bacteria y *Cryptosporidium* spp. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que estos microorganismos a pesar de tener características relacionadas con su resistencia al medio ambiente no presentan una asociación estadísticamente significativa, ya que la presencia de uno no depende de la presencia del otro independientemente de las variables ambientales tomadas en cuenta durante este estudio.

Palabras clave: *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Clostridium perfringens*, agua potable, agua sedimentada, agua cruda, planta potabilizadora.

ABSTRACT

Protozoa such as *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. can cause both asymptomatic and severe infections in adults and children. *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts are commonly transported through water and are also environmentally resistant. Therefore, this research sought to determine the association between these parasites and an indicator. In this case, the bacterium *Clostridium perfringens* was selected because the indicator must meet certain characteristics, such as being universally present in many human and warm-blooded animal fecal samples, being easily detectable by simple methods, and not growing in water under natural conditions. In the case of public health parasites, the presence of cysts and oocysts must be accurately determined, so a reliable method for detecting and enumerating these pathogenic organisms is required. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. were detected using the IMS/FA filtration analysis technique and immunomagnetic separation according to EPA method 1623.1-2012, obtaining positive samples of both parasites in settled and raw water. However, drinking water samples remained negative during both seasons, and the viability of cysts and oocysts was also determined using immunofluorescence assays included in this technique. Furthermore, the ISO 14189:2013 method was used for the enumeration of *Clostridium perfringens* to determine the association between this bacteria and *Cryptosporidium* spp. The results obtained in this study demonstrated that these microorganisms, despite having characteristics related to their environmental resistance, do not present a statistically significant association, since the presence of one does not depend on the presence of the other, regardless of the environmental variables considered in this study.

Keywords: *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Clostridium perfringens*, drinking water, settled water, raw water, water treatment plant.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos pueden ser eliminados a través de materia fecal humana y de algunos animales en los afluentes y torrentes de agua, siendo los protozoos, los de mayor importancia médica (Gesche et al., 2003). De acuerdo con este autor, entre los protozoos patógenos se encuentra *Cryptosporidium parvum*, el cual se relaciona con individuos inmunodeprimidos. La criptosporidiosis, es una enfermedad gastrointestinal grave causada por la infección de *Cryptosporidium* y representa una amenaza significativa para bebés, niños pequeños e individuos inmunodeprimidos. Las enfermedades relacionadas con el agua son responsables de la mayor cantidad de muertes y enfermedades en todo el mundo, con más de 3,4 millones de muertes cada año. Los niños representan alrededor de 1,4 millones de estas muertes (Abuseir, 2023)

La ausencia de un tratamiento o vacuna eficaz ha supuesto un desafío considerable para la salud pública. En la actualidad una hay una investigación, la cual está progresando hacia la comprensión de los mecanismos moleculares, haciendo hincapié en la exploración de las vías de señalización activadas después de la infección y sus funciones reguladoras en la defensa del huésped contra el parásito. Es necesario seguir desarrollando inhibidores dirigidos a componentes clave de estas vías de señalización para interrumpir las vías de señalización cruciales para la supervivencia de *Cryptosporidium*, impidiendo así su capacidad de infectar y replicarse (Lu et al., 2025). Es importante considerar que para adquirir la infección solamente se requieren de 1-10 ooquistes maduros, siendo estas sus formas infectantes, las cuales contaminan el agua de consumo y alimentos (Jay, 1992; Gray, 1996). Los ooquistes son pequeños y en promedio pueden medir de 4-6 μm , por lo tanto, se dificulta su filtración (Ribas et al., 2000; APHA, 2001).

Estos pequeños ooquistes podrían ser hallados en agua clorada aún en ausencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal (Gray, 1996), y esto se debe a que son resistentes a la cloración y por ende no se puede asegurar que el agua tratada esté exenta de ellos (Hijnen et al., 2000; APHA, 2001).

Giardia spp. también corresponde a un protozoo flagelado de importancia para la salud pública, ya que provoca una infección ampliamente distribuida en todas las latitudes y continentes, encontrándose dentro de las enteroparasitosis más frecuentes en menores de 12 años (Organización Mundial de la Salud, 1995; Atías, 1999). Las formas infectantes reciben el nombre quistes, los cuales pueden medir alrededor de 8-12 μm de largo y 7-10 μm de ancho (Atías, 1999). Los quistes son eliminados por las heces y poseen la característica de ser viables por períodos de hasta dos meses en agua fría, sobreviviendo

a condiciones adversas e incluso a la cloración de las aguas (Atías, 1999; Glynn y Heinke, 1999).

Debido a la dificultad en el aislamiento de cada uno de estos agentes patógenos existentes en el agua, que por efecto de dilución se encuentran en baja cantidad (OMS, 1995; Gray 1996), se ha optado por el uso de indicadores de contaminación, los cuales se definen como grupos de microorganismos no patógenos, pero frecuentemente asociados con los mismos (Thatcher y Clark, 1973; ICMSF, 1981). Históricamente los microorganismos indicadores han sido elegidos de acuerdo con determinados criterios; como: ser universalmente presentes en gran número en las heces de los seres humanos y animales de sangre caliente, deben poder ser fáciles de detectar por métodos sencillos y no deben desarrollarse en el agua en condiciones naturales. Además, es indispensable que su persistencia en el agua y grado en que se eliminan durante el tratamiento de ésta, sean similares a los de los patógenos (OMS, 1995; Gray, 1996). Los indicadores más usados son los coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, estreptococos fecales y esporas de anaerobios sulfito-reductores (Payment y Franco, 1993; OMS, 1995).

Los anaerobios sulfito-reductores son un grupo asociado a los *Clostridium* spp. y se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas, que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Clostridium perfringens* (OMS, 1995) que, de acuerdo con un estudio realizado en algunos sistemas hidrológicos de Estados Unidos, fue detectado en un 73% de las muestras, demostrando así su presencia en las aguas naturales al igual que los coliformes (Francy et al., 2000). Son deteriorantes, ya que producen malos olores y con mucha frecuencia, ennegrecimiento del producto cuando éste tiene hierro, formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro (Merck, 2000). Estos microorganismos tienen la capacidad de reducir los sulfitos a sulfuros a partir de aminoácidos y compuestos azufrados (Mac Faddin, 1980) y para su detección se utiliza la evidente coloración negra dada por la formación del precipitado (Merck, 2000).

El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden proceder de otras fuentes ambientales (OMS, 1995) como suelo, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, heridas infectadas del hombre o animales (Sneath et al., 1986), aguas superficiales y también en los alimentos, especialmente cuando las condiciones de higiene en la elaboración son deficientes.

Debido a las características que poseen los anaerobios sulfito-reductores es que se han propuesto como indicadores de contaminación de alto riesgo del agua. La ventaja más

importante es que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliforme y son resistentes a la desinfección, al punto que pueden ser detectados en algunas muestras de agua después de haber recibido predesinfección, floculación, sedimentación, filtración y la desinfección terminal (Payment, 1991). Por las razones expuestas, el aislamiento de anaerobios sulfito-reductores se propone para indicar el riesgo de sobrevivencia de agentes patógenos en ciertos ecosistemas expuestos a contaminación fecal remota, como también que, por sus características de tamaño y resistencia a la desinfección, logren escapar a los tratamientos habitualmente aplicados al agua (Payment y Franco, 1993; OMS, 1995; Cho et al., 2000).

Debido al problema sanitario que ocasiona la presencia de parásitos protozoos en el agua es importante mencionar que en los países industrializados los sistemas que se han desarrollado para el tratamiento de agua de consumo humano han logrado con éxito la práctica eliminación de bacterias, pero no se puede afirmar lo mismo para un buen número de los virus y de los protozoos, fundamentalmente en su estado de quiste u ooquiste (Doménech, 2003).

Entre los parásitos transmitidos por el agua los más comunes son *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., pudiendo provocar brotes de diarrea entre la población humana, debido a que los quistes y ooquistes son resistentes a la desinfección y no se inactivan mediante la cloración que se aplica generalmente en las plantas de tratamiento de agua de consumo humano (OMS, 2011).

El problema de las patologías derivadas de la aparición de estos parásitos en el agua potable no radica tanto en su virulencia sino en la presumible indefensión que se encuentra la sociedad desarrollada frente a unos agentes que atraviesan con relativa facilidad las barreras de las Plantas Potabilizadoras y para los que, por lo menos en el caso de la criptosporidiosis, no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz (Doménech, 2003).

Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones para encontrar mejores métodos para evaluar la calidad microbiana del agua potable. Estos estudios han demostrado que las bacterias indicadoras tradicionales frecuentemente indican que el agua está libre de contaminación fecal, aunque virus, ooquistes y quistes de protozoos y aquellas bacterias capaces de desarrollar formas de resistencia (esporas) estén presentes, demostrando que no son totalmente confiables.

Los métodos para detectar e identificar protozoos patógenos en muestras ambientales generalmente constan de tres pasos principales; recolección y concentración de muestras;

purificación o separación del organismo objetivo de otras partículas en la muestra; y un ensayo de detección, las muestras generalmente se filtran o centrifugan para concentrar los organismos, el concentrado también puede contener organismos no objetivo y desechos orgánicos e inorgánicos, por lo que los procedimientos de purificación, centrifugación en gradiente de densidad (flotación) y separación inmunomagnética (IMS) pueden usarse para minimizar la cantidad de material interferente en el concentrado. Los ensayos pueden implicar un examen microscópico de determinación colorimétrica utilizando tintes o inmunofluorescencia, esta serie de procedimientos se reúnen a través del método EPA 1623.1. 2012 (Brandi y Wilson-Wilde, 2013).

Entre los métodos de cuantificación de indicadores bacterianos para la determinación de calidad del agua, se describe el sistema del «filtro de membrana» ISO 14189:2013, método que ha sido empleado por varios autores para la determinación de anaerobios sulfitorreductores y/o *Clostridium* spp. en agua de manera que algunas reseñas bibliográficas demuestran un mayor uso y las ventajas de la técnica del filtro de membrana para la determinación de anaerobios-sulfito reductores en agua, argumentando mayor precisión en los datos numéricos obtenidos y la posibilidad de filtrar grandes volúmenes, con lo cual se pueden detectar cantidades bajas de los indicadores (Gesche, 2003).

El método EPA 1623.1. 2012 actualmente ha sido validado solo para aguas superficiales, sin embargo, también ha sido empleado por algunos laboratorios que buscan observar si este método también es aplicable para el agua tratada y de esa manera poder validarlo también para esta matriz.

El Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacional (IDAAN) tiene como objetivo replicar el método EPA 1623.1. 2012 implementándolo para agua tratada, ya que este posee un porcentaje de recuperación mayor que otros métodos, con el fin de evaluar la eficacia del sistema de tratamiento de La Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera. Simultáneamente en este estudio también se busca observar la presencia de *Clostridium perfringens* como posible indicador de la presencia de *Cryptosporidium* spp. en agua empleando el método ISO 14189:2013 y determinar su relación, de manera que en base a los resultados se podría evaluar si los procesos de tratamiento realizados por la Planta Potabilizadora son eficaces o deben realizarse ciertas sugerencias para su mejoramiento.

Justificación

En Panamá, la Constitución Política de la República establece que es responsabilidad del Estado garantizar el acceso a agua apta para el consumo humano a toda la población, en conjunto con el Órgano Ejecutivo, a través del Ministerio de Salud, ente a cargo de establecer las normas técnicas y reglamentaciones referentes a la calidad de agua potable, y de vigilar la calidad de agua potable que es abastecida a la población en ejercicio de su función de salud preventiva (Decreto Ley No 2. de 7 de enero de 1997, Art. 8 Numeral 11, Art. 9). Estas funciones son ejercidas a nivel nacional a través de la Dirección del Subsector de Agua Potable y Alcantarillado Sanitario, el IDAAN como entidad prestadora del servicio a nivel regional por las diferentes Direcciones Regionales de Salud (MICI,2019).

Debido a que constantemente se busca el mejoramiento de la calidad del agua para consumo a través de las gestiones gubernamentales y entes investigativos, debe cumplirse con los parámetros que dictan las normas para que la población reciba el recurso de manera apta, por lo tanto, la detección de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. y la identificación de *Clostridium perfringens* como posible indicador de estos parásitos en el sistema de tratamiento de agua potable de la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera es imprescindible, dado que el objetivo es determinar si el agua tratada cuenta con los parámetros correspondientes o no para su consumo, ya que puede representar un futuro problema sanitario para la población abastecida.

Según lo establecido en el REGLAMENTO TÉCNICO DGNTI-COPANIT 21 – 2019 TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, AGUA POTABLE, DEFINICIONES Y REQUISITOS GENERALES., son de fiel cumplimiento los parámetros Físicos, Químicos y Biológicos que deben reunir las aguas de consumo humano para ser consideradas potable, por lo tanto, para garantizar el cumplimiento del reglamento deben monitorearse los controles de estos parámetros, la implementación de métodos con mayor porcentaje de recuperación, para la detección de parásitos como *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. La técnica de filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA. EPA 1623.1-2012 reconocida por el MÉTODO ESTÁNDAR. EDICIÓN 23/ 9711 B y El método de filtración por membrana establecido por la Norma ISO 14189:2013 para la detección de *Clostridium perfringens*.

Tabla 1. Valores para los parámetros Biológicos

Parámetros	Unidades	Valor permitido
Coliformes Totales	NMP/100 ml. UFC/100ml	< 1.1 < 1
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml. UFC/100ml	< 1.1 < 1
<i>Giardia</i> spp.	Nº quistes/volumen filtrado (L)*	< 1*
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Nº quistes/volumen filtrado (L)*	< 1*

Nota. *Dependiendo de la técnica y el volumen filtrado, el valor permitido será el mínimo detectado por la técnica como valor ausente. Fuente: (MICI, 2019).

Tabla 2. Valores para los parámetros fisicoquímicos

Parámetros	Unidades	Valor Permitido
Turbiedad	UNT	1
Potencial de Hidrógeno	Unidades de pH	6,5-8,5
Cloro residual libre	mg/L	0,3-0,8

Nota. Fuente: (MICI, 2019)

En cuanto a *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. al ser parásitos con una resistencia eficaz a los procesos de cloración, al igual que estos parásitos la bacteria *Clostridium perfringens*, posee la facultad de formar endosporas, característica que favorece su resistencia a condiciones adversas, por lo tanto la determinación de la asociación de *Clostridium perfringens* con *Cryptosporidium* spp., favorece a la optimización de la detección de ooquistes en el agua tratada, ya que es importante que estos patógenos estén ausentes posteriormente al proceso de filtración y almacenamiento para luego ser bombeada a las redes de distribución.

De acuerdo con estudios previamente realizados se ha reportado la presencia de parásitos protozoos en la Planta Potabilizadora de La Chorrera; al igual que otros estudios realizados por el ICGES en los que se ha observado una alta prevalencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en niños del área de La Chorrera, lo que no descarta que estos estudios estén relacionados. Por lo tanto, es importante tomar en cuenta esta información como referencia de la presencia de estos parásitos en la población, y poder evaluar si efectivamente aún se mantienen presentes en el agua tratada de la Planta

Potabilizadora y cuales podrían ser los factores que afectan la calidad del agua durante el proceso de tratamiento y de esa manera poder contribuir al mejoramiento del sistema de tratamiento de agua potable.

Definición del problema

El REGLAMENTO TÉCNICO DGNTI-COPANIT 21 – 2019 TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, AGUA POTABLE, DEFINICIONES Y REQUISITOS GENERALES, ha incluido parámetros de microbiológicos para el agua potable, como la ausencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., esta inclusión tiene como objetivo garantizar la calidad del agua para consumo humano; por lo tanto, se busca determinar la existencia de alguna posible asociación entre estos parásitos y la bacteria *Clostridium perfringens*, mediante la técnica de análisis por filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. de la Epa para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. y el método 14189:2013 para la enumeración de *Clostridium perfringens* de la Norma ISO, con muestras colectadas del sistema de tratamiento de la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero. Esto se debe a que la técnica para parásitos ya antes mencionada presenta algunas limitaciones a nivel de costos para los laboratorios que deseen realizarla.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

Detectar la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. asociada a *Clostridium perfringens* en el sistema de tratamiento de la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en el agua cruda, sedimentada y tratada través del método 1623.1-2012 de la EPA.
- Determinar mediante el método de Filtración de Membrana. ISO 14189:2013. la presencia de *Clostridium perfringens* como un posible indicador de la presencia de *Cryptosporidium* spp. en el sistema de tratamiento.

Hipótesis

H1: Hay presencia *Clostridium perfringens* asociada a la detección de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera.

H0: No hay presencia *Clostridium perfringens* asociada a la detección de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes históricos de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp.

Es posible afirmar que la historia de la protozoología nació a mediados del siglo XVII, cuando Anthon Van Leeuwenhoek de Delphis; comerciante holandés de telas y tallador aficionado de lentes observó por primera vez a través de los rudimentarios microscopios fabricados por él mismo, un organismo que, por su descripción, muy probablemente correspondía a *Giardia lamblia*. El descubrimiento del protozoo fue descrito en una de sus comunicaciones a la Royal Society of London, el 4 de noviembre de 1681. Inclusive hace referencia de los síntomas que él mismo presentaba. Sus lentes le permitieron a Leeuwenhoek observar un sinúmero de “animalículos” como él los denominó encontrados en agua, saliva, heces, etc. (Tsuji et al., 2009).

Giardia intestinalis es el protozoo más común en el humano, presentando una distribución mundial que va desde los trópicos hasta el Ártico. Debido a que la transmisión de *Giardia* spp. requiere de la ingestión de quistes del parásito, los niveles de sanidad ambiental son inversamente proporcionales a la prevalencia de la enfermedad; así, las prevalencias más altas se observan en países en vías de desarrollo. De esta manera, las cifras de prevalencia más altas se encuentran localizadas en regiones tropicales y subtropicales, en donde es frecuente la contaminación de agua o alimentos con materia fecal, lo que se traduce en cifras de frecuencia de infección elevadas en niños y adultos. Lo anterior es un indicador que refleja las bajas condiciones de higiene que guardan la mayor parte de países en vías de desarrollo. Por otra parte, en los países desarrollados la resistencia de los quistes de *Giardia* spp. a las medidas convencionales de tratamiento de agua ha contribuido a la presencia de brotes de giardiasis, transmitidos a través del agua (Tsuji et al., 2009).

Cryptosporidium spp. fue descrito por Ernest Edward Tyzzer en 1907; en 1910 se propuso *Cryptosporidium muris* el cual fue descrito detalladamente y en 1912 se reporta *Cryptosporidium parvum* con estadias de desarrollo sólo en el intestino delgado de ratones comunes (de la Parte et al., 2005).

En 1976, se descubrió que *Cryptosporidium* spp. infectaba a las personas y la transmisión por el agua se confirmó por vez primera en 1984 (Organización Mundial de la Salud, 2018). La aparición de brotes se ha relacionado con el agua de consumo humano, las aguas recreativas y, en menor medida, los alimentos contaminados. En 1993, *Cryptosporidium* spp. provocó el mayor brote registrado de enfermedad transmitida por

el agua: más de 400 000 personas se infectaron a través del sistema de abastecimiento de agua de consumo humano de Milwaukee (EE. UU.) (Doménech, 2003).

1.2.Descripción general de los parásitos

1.2.1. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. un protozoo perteneciente al phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidiasina, orden Eucoocidiida, suborden Eimerina y familia Cryptosporidiidae. (Pérez, 2010).

Los coccidios del género *Cryptosporidium* spp. son parásitos intracelulares obligados con un ciclo biológico complejo, que incluye la reproducción sexual y asexual. La presencia de dos tipos de ooquistes morfofuncionales, uno de pared gruesa que se eliminan por medio de las heces del hospedero infectado y otro de pared fina (o delgada) el cual no es excretado en las heces; sin embargo poseen una capacidad autoinfectiva que da inicio al ciclo en el hospedador parasitado (Pérez, 2010). Los parásitos son esféricos o elípticos. y se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas. Los ooquistes presentan cuatro esporozoitos, sin esporocistos, son ovoides y pueden medir entre 4,5 y 7,9 μm (Rodríguez, y Royo ,2008).

El género *Cryptosporidium* está compuesto por unas 13 especies (OMS, 2011) las cuales difieren en un rango de hospedadores. La coevolución parásito-hospedador, la adaptación del hospedador y la segregación geográfica han llevado a la formación de familias de subtipos con rasgos fenotípicos únicos dentro de las principales especies patógenas (Feng, Y. et al., 2018), las que en su mayoría producen infecciones en humanos como *C. hominis*. y genotipo del ganado *C. parvum*. (OMS, 2011).

***Giardia* spp.**

El género *Giardia* está formado por protozoos flagelados que parasitan el aparato digestivo del ser humano y de ciertos animales. El género *Giardia* comprende diversas especies (OMS, 2011) según la especificidad del hospedador, se han descrito 41 especies diferentes de *Giardia* (Radman, 2023), pero la infección que afecta a las personas (giardiasis) suele atribuirse a la especie *G. intestinalis*, también conocida como *G. lamblia* o *G. duodenalis*. El ciclo biológico de *Giardia* es relativamente sencillo: comprende un trofozoíto flagelado que se reproduce en el aparato digestivo y un quiste infeccioso de pared gruesa que se elimina en las heces de forma intermitente, pero en grandes cantidades. Los trofozoítos presentan simetría bilateral y tienen forma elipsoidal. Los quistes son ovoides y su diámetro es de 8 a 12 μm (OMS, 2011).

1.3.Epidemiología

1.3.1. Efectos de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. sobre la salud humana

El autor Ongerth et al., (2018) describe el reconocimiento relativamente reciente (décadas de 1960 a 1980) de ambos organismos como patógenos transmitidos por el agua capaces de causar "brotes" a escala comunitaria esto se debe al desarrollo de tecnología adecuada para encontrarlos en el medio ambiente (Efstratiou et al., 2017). En una revisión reciente de brotes transmitidos por el agua debido a *Cryptosporidium* y *Giardia* Efstratiou et al., (2017) señala que la distribución de los informes de brotes es más un reflejo de la existencia de sistemas de vigilancia y la dedicación de recursos a los informes que de la verdadera distribución de estos organismos en los suministros de agua y la aparición de enfermedades debido a su transmisión a través de suministros públicos de agua (Ongerth et al., 2018).

Efectos sobre la salud humana *Giardia* spp. se conoce como parásito humano desde hace 200 años. El agua es una de las principales vías de transmisión enfermedades zoonóticas como criptosporidiosis y giardiasis; por esta razón, la presencia de protozoarios como *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., representan un desafío importante para los sistemas de producción de agua para consumo humano (Instituto Nacional de Salud, 2022), ya que tras la ingestión de los quistes y su exquistación, los trofozoítos se adhieren a las superficies del aparato digestivo. Las infecciones pueden ser asintomáticas, tanto en adultos como en niños. En guarderías, hasta el 20% de los niños pueden ser portadores de *Giardia* spp. y excretar quistes sin presentar síntomas clínicos. Los síntomas de la giardiasis pueden derivarse de los daños provocados por los trofozoítos, aunque existe controversia sobre los mecanismos por los que el microorganismo causa diarrea e hipoabsorción intestinal. Los síntomas suelen incluir diarrea y cólicos; sin embargo, en casos graves pueden aparecer trastornos de hipoabsorción, principalmente en niños de corta edad. La giardiasis es una enfermedad de resolución espontánea en la mayoría de los casos, aunque en algunos pacientes puede hacerse crónica y durar más de un año, incluso en personas anteriormente sanas (OMS, 2011).

Cryptosporidium spp. generalmente provoca diarrea de resolución espontánea, acompañada en ocasiones de náuseas, vómitos y fiebre, que en personas sanas suelen desaparecer en una semana, pero pueden prolongarse durante un mes o más. La gravedad de la criptosporidiosis varía según la edad y el estado inmunitario; las infecciones en personas con inmunodeficiencia grave pueden ser mortales (OMS, 2011). La infectividad de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. es relativamente alta. Los estudios realizados

con voluntarios sanos revelaron que la ingestión de menos de 10 ooquistes puede provocar una infección (Doménech, 2003).

1.4. Fuente de propagación

1.4.1. *Giardia* spp.

Giardia puede multiplicarse en muy diversas especies animales, incluido el ser humano, que excretan quistes al ambiente. Se han notificado hasta 88 000 quistes por litro en aguas residuales sin tratar y hasta 240 por litro en aguas superficiales. Los quistes son resistentes y pueden sobrevivir durante semanas o meses en agua dulce. Se ha confirmado la presencia de quistes en fuentes de agua cruda y en sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano. Sin embargo, no se dispone de información acerca de la presencia de especies infecciosas para el ser humano. Las técnicas convencionales de análisis disponibles en la actualidad proporcionan una medida indirecta de la viabilidad de los microorganismos, pero no de su infectividad para el ser humano. También se detectan quistes en aguas recreativas y en alimentos contaminados (OMS, 2011).

1.4.2. *Cryptosporidium* spp.

Los reservorios de *C. hominis* y *C. parvum* incluyen una gran variedad de animales, pero las personas y el ganado, sobre todo los animales jóvenes son las fuentes más importantes de microorganismos que infectan a las personas. Los terneros pueden excretar 1010 ooquistes al día. Se han notificado concentraciones de hasta 14 000 ooquistes por litro en aguas residuales crudas y de 5800 ooquistes por litro en aguas superficiales. Los ooquistes pueden sobrevivir semanas o meses en agua dulce. Se han detectado ooquistes de *Cryptosporidium* en muchos sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano. No obstante, en la mayoría de los casos, hay poca información acerca de la presencia de especies con capacidad de infectar al ser humano. Las técnicas convencionales de análisis disponibles en la actualidad proporcionan una medida indirecta de la viabilidad de los microorganismos, pero no de su infectividad para el ser humano. También hay ooquistes en aguas de uso recreativo (OMS, 2011).

1.5. Vías de exposición

La vía de transmisión de *Giardia* y *Cryptosporidium* es por la vía fecal-oral. La principal vía de infección es el contacto de persona a persona, sobre todo entre niños. El agua de consumo humano, las aguas recreativas y, en menor medida, los alimentos contaminados

los cuales se han relacionado con la aparición de brotes. Se ha sugerido que el contacto directo con animales de granja y, posiblemente, animales domésticos infectados podrían ser fuentes de transmisión de organismos como *Giardia* y *Cryptosporidium* los cuales resultan ser infecciosos para el ser humano. (OMS, 2011).

1.5.1. Ciclo de vida de *Giardia* spp.

Los quistes son formas resistentes y son responsables de la transmisión de la giardiasis. Tanto los quistes como los trofozoítos se pueden encontrar en las heces (etapas de diagnóstico). Los quistes son resistentes y pueden sobrevivir varios meses en agua fría. La infección se produce por la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados o por vía fecal-oral (manos o fómites). En el intestino delgado, la escisión libera trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos). Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal, permaneciendo en la luz del intestino delgado proximal donde pueden estar libres o adheridos a la mucosa por un disco de succión ventral. La enquistación ocurre cuando los parásitos transitan hacia el colon. El quiste es la etapa que se encuentra con mayor frecuencia en las heces no diarreicas. Debido a que los quistes son infecciosos cuando se eliminan en las heces o poco después, es posible la transmisión de persona a persona. Si bien los animales están infectados con *Giardia*, su importancia como reservorio no está clara (CDC, 2017).

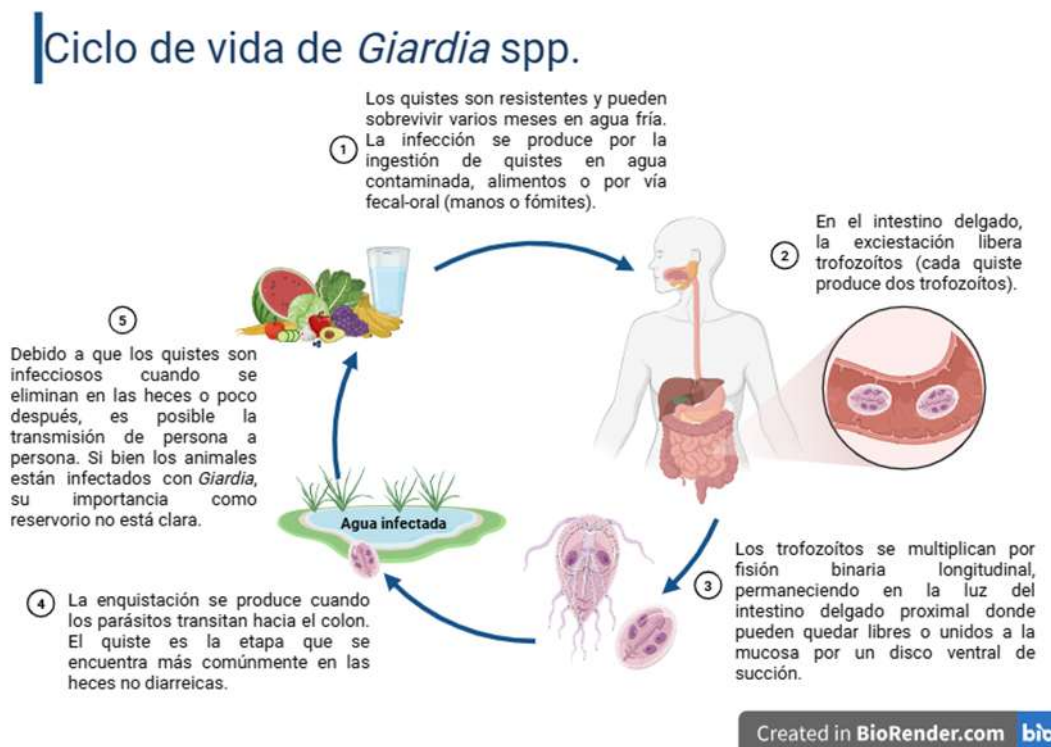


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia* spp.

1.5.2. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

Los ooquistes esporulados, que contienen 4 esporozoítos, son excretados por el huésped infectado a través de las heces (y posiblemente por otras vías, como las secreciones respiratorias). Transmisión de *Cryptosporidium* spp. ocurre principalmente a través de la ingestión de agua contaminada con heces (p. ej., agua para beber o recreativa) o alimentos (p. ej., leche cruda) o después del contacto directo con animales o personas infectadas. Después de la ingestión (y posiblemente la inhalación) por parte de un huésped adecuado, se produce una excitación. Los esporozoitos se liberan y parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal (y posiblemente el tracto respiratorio). En estas células, generalmente dentro del borde en cepillo, los parásitos experimentan una multiplicación asexual (esquizogonia o merogonía). Y después de multiplicación sexual (gametogonia) producen microgametos (macho) y macrogametos (hembra). Tras la fertilización de los macrogametos por los microgametos que se desprenden del microgameto, los ooquistes se desarrollan y esporulan en el huésped infectado. Los cigotos dan lugar a dos tipos diferentes de ooquistes (de pared gruesa y de pared delgada). Los ooquistes de paredes gruesas se excretan del huésped al medio ambiente, mientras que los ooquistes de paredes delgadas participan en el ciclo autoinfeccioso interno y no se recuperan de las heces. Los ooquistes son infecciosos tras la excreción, lo que permite la transmisión fecal-oral directa e inmediata. Se han informado estadios extracelulares, pero su relevancia en el ciclo de vida general no está clara (CDC, 2019).



Figura 2. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

1.6. Importancia de la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua de consumo humano

Se han relacionado brotes de giardiasis transmitida por el agua con sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano durante más de 30 años; en cierta etapa, *Giardia* spp. fue la causa identificada más frecuente de brotes transmitidos por el agua en los Estados Unidos. Los quistes de *Giardia* spp. son más resistentes a los desinfectantes oxidativos, como el cloro, que las bacterias entéricas, pero no tanto como los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Se necesitan de 25 a 30 minutos para inactivar el 90% de los microorganismos en agua con una concentración residual de cloro libre de 1 mg/l. En un plan de seguridad del agua, para gestionar el riesgo potencial derivado de *Giardia* spp. pueden aplicarse, como medidas de control, la prevención de la contaminación de fuentes de agua por residuos humanos y animales, su posterior tratamiento y desinfección adecuados, y la protección del agua durante su distribución. Dada la resistencia de los quistes a los desinfectantes, no se puede confiar en el análisis de *E. coli* (o bien de coliformes termotolerantes) como indicador de la presencia o ausencia de *Giardia* spp. en sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano (OMS, 2011).

El rol del agua de consumo humano en la transmisión de *Cryptosporidium* spp. en brotes epidémicos que afectaron a un número de personas considerable, está bien documentado. Por lo tanto, es importante prestar atención a estos organismos. Los ooquistes son extremadamente resistentes a desinfectantes oxidantes como el cloro, pero investigaciones basadas en pruebas de infectividad han demostrado que la irradiación con luz ultravioleta inactiva los ooquistes. En un plan de seguridad del agua, las medidas de control orientadas a reducir el riesgo potencial derivado del *Cryptosporidium* spp. deben centrarse en la prevención de la contaminación de fuentes de agua por residuos humanos y del ganado, el tratamiento adecuado del agua y la protección durante su distribución. Debido a su tamaño relativamente pequeño, la remoción de los ooquistes mediante procesos de filtración con medios granulares es problemática; solo con sistemas bien diseñados y gestionados puede conseguirse una eliminación aceptable. Los procesos de filtración de membrana que proporcionan una barrera física directa pueden constituir una alternativa viable para la eliminación eficaz de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Dada la excepcional resistencia de los ooquistes a los desinfectantes, no se puede confiar en el análisis de *E. coli* (o bien de coliformes termotolerantes) como indicador de la presencia

o ausencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en los sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano (OMS, 2011).

1.7. Técnicas de análisis de agua empleadas para la detección de protozoos entéricos:

1.7.1. Métodos de detección de los quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de consumo humano.

Existen métodos estándar para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de bebida (por ejemplo, los de la Organización Internacional de Normalización [2006], la Environment Agency [2010] o la Environmental Protection Agency [2012]) y en verduras de hoja verde frescas y frutos rojos, que se basan en la filtración, elución, concentración, separación inmunomagnética e IFM de un volumen grande (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

De acuerdo Xiao et al., (2018) actualmente, el monitoreo de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua se realiza en gran parte mediante el Método 1623 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), que implica filtración, aislamiento de (oo)quistes por separación inmunomagnética, ensayo de inmunofluorescencia (Efstratiou et al., 2017). Sin embargo, el alto costo del Método 1623 ha restringido su uso en la mayoría de los países en desarrollo. Una revisión reciente encontró que solo el 5% de las publicaciones sobre la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de América Central/del Sur y África adoptaron el Método 1623 (Efstratiou et al., 2017).

1.7.1.1. Métodos inmunológicos

Se ha comprobado que resultan útiles tres sistemas de detección inmunológica de antígenos de los ooquistes de *Cryptosporidium*: la microscopía de inmunofluorescencia (IFM), el ELISA y el IC, y existe gran variedad de kits comerciales. Los kits de IFM son más específicos en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* de frotis fecales que las tinciones convencionales, y pueden resultar también más sensibles para este fin (Chalmers y Katzer, 2013). Los límites de detección de ELISA y de IC se encuentran en el intervalo de entre 3×10^5 a 10^6 ooquistes por ml (Anusz et al., 1990; Smith, 2008), lo cual no indica una sensibilidad mayor que la de la microscopía convencional, pero sí una sensibilidad menor que la de la IFM. Las reacciones positivas deberán confirmarse con otros métodos (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

1.7.1.2. Microscopía de inmunofluorescencia directa (dIFM)

En la dIFM, se emplea un MAb anti-Cryptosporidium conjugado a FITC (FITC-C-MAb) que reconoce epítomos de superficie de los ooquistes. No distingue entre diferentes especies de *Cryptosporidium*. La epifluorescencia que se genera al usar un sistema de filtro FITC hace que los ooquistes marcados presenten una fluorescencia de color verde manzana brillante. Los materiales que vienen con los kits comerciales no son siempre los mismos, pero pueden incluir controles positivos y negativos para ooquistes de *C. parvum*, MAb antiCryptosporidium marcado con FITC (a la dilución de trabajo; no sirve de nada diluirlo), y medio de montaje con glicerol que contenga un inhibidor del fotoblanqueo. Cada vez que se lleve a cabo este procedimiento debe incluirse un porta control positivo y uno negativo (normalmente vienen con el kit). Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se pueden comprar a proveedores comerciales, a laboratorios veterinarios de diagnóstico a centros de investigación. Los posibles ooquistes se miden aumentando lentamente el voltaje (intensidad lumínica) de la fuente de luz de campo claro de tal forma que puedan observarse a la vez tanto imágenes fluorescentes como de campo claro. Los objetos se pueden medir con la retícula del ocular. Tras teñir y montar los portas según las instrucciones del fabricante, se debe comprobar si las preparaciones contienen ooquistes examinándolas con el objetivo de $\times 20$ y confirmando el resultado con el de $\times 40$ de un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro FITC (longitud de onda máxima de la excitación: 490 nm, longitud de onda media de la emisión: 530 nm). Los ooquistes se miden con el objetivo de $\times 100$. Si es necesario, los portaobjetos se pueden conservar a temperatura ambiente, en la oscuridad, hasta que se examinen. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son elementos redondos o ligeramente ovoides que presentan una fluorescencia de color verde manzana brillante bajo el filtro FITC. A menudo, la fluorescencia es más intensa en la parte periférica, sin interrupciones visibles en la tinción de la pared del ooquiste. Si el kit incluye azul de Evans, que reduce la fluorescencia inespecífica, la fluorescencia de fondo será roja. Si incluye DAPI como contratinción, los núcleos presentarán una fluorescencia azul. La fluorescencia inespecífica suele ser amarilla. Siempre debe tenerse en cuenta cómo es el control positivo y asegurarse de que el tamaño, la forma y el color del posible ooquiste coincidan con los de dicho control. Los resultados deben presentarse igual que en el caso de la microscopía convencional (arriba). Los números se pueden registrarse tal como se hayan identificado anteriormente (USEPA, 2012).

Para apoyar la futura regulación de los protozoos en el agua potable, las Enmiendas a la Ley de Agua Potable Segura de 1996 exigen que la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) evalúe el riesgo para la salud pública que representa por contaminantes del agua potable, incluidos parásitos transmitidos por el agua, como *Cryptosporidium* y *Giardia*. Para implementar estos requisitos, la EPA debe evaluar la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en superficies crudas. Aguas utilizadas como fuente de agua para plantas de tratamiento de agua potable. El método 1623 de la EPA fue desarrollado para apoyar esta evaluación.

El Método Microscopía de inmunofluorescencia directa (dIFM) fue utilizado en estudios realizados para la detección de parásitos como *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua potable en el año 1997 en Panamá, pero debido a la constante búsqueda y evolución tecnológica respecto a nuevos métodos de análisis, se ha sugerido el uso de métodos actualizados los cuales permitan la obtención de resultados con mayor eficiencia en un menor tiempo de respuesta, de manera que a medida que se incremente la necesidad de una mayor obtención de soluciones a problemas respecto al agua para consumo humano, también contribuya al reforzamiento continuo de las normas que establecen los parámetros adecuados para el agua potable.

1.7.1.3. Método EPA 1623.1 2012: *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua por filtración/IMS/FA

El método 1623.1 consiste en filtrar una muestra de agua y los ooquistes, quistes y materiales extraños se retienen en el filtro. Aunque la EPA sólo ha validado el método utilizando filtración de laboratorio de muestras de agua a granel enviadas desde el campo, también se puede utilizar la filtración de campo. Este método se basa en las siguientes etapas:

- **Elución y separación**

Se eluyen los materiales del filtro y el eluato se centrifuga para sedimentar los ooquistes y quistes, y se aspira el líquido sobrenadante. Los ooquistes y quistes paramagnéticos se separan de los materiales extraños utilizando un imán y los materiales extraños se descartan y el complejo de perlas paramagnéticas se desprende de los ooquistes y quistes.

- **Enumeración**

Los ooquistes y quistes se tiñen en portaobjetos con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia y DAPI. La muestra teñida se examina mediante microscopía de

fluorescencia y DIC. El análisis cualitativo se realiza escaneando cada portaobjetos en busca de objetos que cumplan con el tamaño, forma y características de fluorescencia de los oocistos de *Cryptosporidium* o de los quistes de *Giardia*. El análisis cuantitativo se realiza contando el número total de objetos en el portaobjetos que cumplen con los criterios FA, DAPI y DIC para oocistos o quistes. La calidad está garantizada mediante calibración y pruebas reproducibles de los sistemas de filtración, IMS, tinción y microscopía (USEPA, 2012).

El Método 1623.1. de la EPA ha sido modificado hasta esta su última versión con el objetivo de mejorar su eficiencia y proporcionar una nueva alternativa de análisis a distintas matrices de agua, que no habían sido inicialmente contempladas mediante este método de análisis.

1.7.1.3.1. Ventajas y Desventajas

Este método tiene varias desventajas. El sitio de unión del anticuerpo de inmunofluorescencia se encuentra en la superficie externa de los oocistos y quistes, y la pared del quiste después de la desencapsulación aún se detectará, lo que puede aumentar la tasa de detección. En segundo lugar, la desinfección con cloro, el aumento de la edad de los parásitos y los cambios ambientales probablemente causen la inactivación de los sitios de unión y reduzcan la tasa de detección. En tercer lugar, el método aún no puede distinguir claramente entre la actividad y las especies de protozoos. Sin embargo, algunas investigaciones que muestran la optimización del proceso EPA1623 podrían mejorar el sistema (Feng, C. et al., 2021). En un estudio reciente se optimizó la etapa de separación inmunomagnética, que reemplazó el elemento filtrante Filta-Max Xpress con una membrana filtrante para una filtración rápida. También reemplazó el compresor de aire con una membrana filtrante de elución ultrasónica para eluir rápidamente el elemento filtrante. Después de la optimización, la tasa de recuperación de la adición estándar de *Giardia* y *Cryptosporidium* es mucho mayor que la tasa de recuperación obtenida al operar siguiendo el estándar nacional (Ye, X. et al. 2017). Los métodos inmunológicos ofrecen mayor especificidad y sensibilidad que la microscopía en la detección de oocistos de *Cryptosporidium* en diversos tipos de muestras ya que utilizan anticuerpos que se dirigen a la pared del oociste (Hassan et al., 2021)

1.7.1.4. Ensayos Moleculares

Es posible combinar la tecnología de separación inmunomagnética (IMS-PCR) para mejorar la especificidad de la PCR. Otras técnicas de biología molecular incluyen la PCR anidada, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), la PCR con transcripción inversa (RT-PCR), la PCR fluorescente multiplex, la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción por PCR (PCR-PFLP) (Feng et al., 2021).

1.7.1.4.1. Ventajas y Desventajas

Debido a las limitaciones de la tecnología inmunológica debido a que el método de análisis microscópico empleado no permite la identificación de *Cryptosporidium* a nivel de especie, ya que durante la separación inmunomagnética (IMS) se utilizan anticuerpos comunes para todas las especies de *Cryptosporidium* para unir las microesferas y los ooquistes, y el enfoque de inmunofluorescencia directa se basó en un antígeno que se une a un anticuerpo común a todo el género (Pignata et al., 2019), de manera que la tecnología molecular se ha desarrollado rápidamente y ha demostrado un gran potencial en la detección de protozoos patógenos. Sin embargo, este método tiene requisitos estrictos en el entorno de prueba y a menudo es sensible a la contaminación del ADN (Feng et al., 2021).

- La PCR anidada utiliza dos pares de cebadores de PCR basados en la PCR tradicional, lo que la hace altamente específica y sensible.
- La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) es la monitorización en tiempo real de todo el proceso de PCR a través de señales fluorescentes en el proceso tradicional de amplificación por PCR. Este método es sensible y específico en la detección cuantitativa de *Cryptosporidium*. Pero este método todavía no puede distinguir ni detectar la actividad de los ooquistes vivos.
- El PCR con transcripción inversa (RT-PCR) se basa en el ARNm para la detección. Los métodos derivados de PCR anteriores se basan en el ADN para la detección. El ADN puede conservarse intacto durante mucho tiempo después de que los ooquistes o quistes mueran, por lo que la tasa de detección es relativamente alta. Solo las células vivas pueden producir ARNm. Este método supera las deficiencias de otros métodos de detección de biología molecular basados en ADN.

- La tecnología de PCR tradicional solo puede detectar un tipo de microorganismo patógeno en cada tubo de reacción de PCR, lo que tiene baja eficiencia y alto costo.
- La tecnología PCR multiplex (multiplex-PCR) puede detectar múltiples microorganismos patógenos al mismo tiempo, ahorrando mano de obra y recursos materiales.
- El análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción por PCR (PCR-RFLP) es una técnica que combina la amplificación por PCR y la digestión con enzimas de restricción para detectar polimorfismos. Utiliza una enzima de restricción específica para cortar el producto amplificado y ejecutarlo en electroforesis en gel. La técnica es simple y puede analizar muestras en poco tiempo. Por lo tanto, es adecuada para biotipificar e identificar múltiples especies de protozoos, como *Cryptosporidium* y *Giardia*.
- La tecnología de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es relativamente nueva. Esta tecnología de amplificación contabiliza la temperatura constante, adecuada para el diagnóstico genético. Esta tecnología utiliza la ADN polimerasa por desplazamiento de cadena para amplificar una gran cantidad en poco tiempo a temperatura constante, lo que produce un gran precipitado blanco de pirofosfato de magnesio. Como resultado, la presencia del gen diana puede observarse a simple vista. Esta tecnología se utilizó por primera vez para detectar *Cryptosporidium* gracias a su alta especificidad, su sencillo funcionamiento y sus bajos requisitos de equipo (la PCR requiere equipos costosos, mientras que la LAMP solo requiere un baño de agua o una incubadora). Por lo tanto, este método es de gran importancia en la práctica.

De acuerdo con Feng et al., (2021) científicos como Hallier-Soulier y Guillot combinaron la separación inmunomagnética y la tecnología de PCR para detectar el número de ooquistes de *Cryptosporidium* en ríos, Fontaine y Guillot utilizaron tecnología de separación inmunomagnética combinada con tecnología de PCR en tiempo real para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en agua del grifo y agua de río y Liao combinaron PCR fluorescente en tiempo real y PCR multiplex para establecer un método dual de detección por PCR fluorescente en tiempo real para *Cryptosporidium* y *Giardia*, creando un sistema mucho más rápido y preciso.

1.7.5. Detección *Clostridium perfringens* en agua para consumo humano.

Clostridium perfringens es ampliamente reconocido como un valioso indicador de contaminación fecal. En el tracto intestinal de animales y humanos, estas bacterias grampositivas forman esporas resistentes al calor, en comparación con las células

vegetativas. *C. perfringens* en el intestino existe tanto en forma de esporas como de células vegetativas; también se encuentran esporas en muestras ambientales. Las esporas de *C. perfringens* sobreviven en el agua durante meses, mucho más tiempo que las bacterias indicadoras fecales vegetativas, por lo que su presencia puede indicar contaminación fecal remota o intermitente. El monitoreo de *C. perfringens* ha demostrado ser útil para evaluar la calidad de los recursos hídricos y para verificar las etapas del tratamiento del agua y evaluar el rendimiento de las plantas de tratamiento. Las esporas no siempre se inactivan mediante procedimientos rutinarios de desinfección (p. ej., cloración) (ISO 14189:2013, 2013)

1.7.5.1. Técnicas de análisis de agua empleadas para la detección de *Clostridium perfringens*:

1.7.5.1.1. Método de filtración sobre membrana: Enumeración de *Clostridium perfringens*.

Un volumen medido de la muestra, o una dilución de este, se filtra a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm suficiente para retener las esporas de clostridios. La membrana se incuba en un agar selectivo/diferencial (agar triptosa-sulfitocicloserina) anaeróbicamente a $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante (21 ± 3) h. *Clostridium perfringens* suele producir colonias negras o de color gris a marrón amarillento como resultado de la reducción de sulfito a sulfuro que reacciona con una sal férrica en el medio. Se cuentan las colonias características y se realizan pruebas de confirmación. El resultado se calcula como el recuento de colonias por volumen de muestra.

Si solo se requiere un recuento de esporas, la muestra se pretrata primero a $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ para inactivar las bacterias vegetativas (ISO 14189:2013, 2013).

1.8. Estudios relacionados a la detección en agua de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en Panamá.

En estudios realizados para agua cruda utilizada por plantas potabilizadoras en algunos centros urbanos, se han encontrado quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la estación seca. En la estación lluviosa, los resultados fueron negativos, a excepción de un estudio en que se encontró *Cryptosporidium* spp. en aguas tratadas. Por otro lado, en la Planta Potabilizadora de Chilibre, que abastece de agua a la mayor parte de la población urbana de la ciudad capital, no se detectó la presencia de

ninguno de estos parásitos. Sin embargo, estudios realizados en la ciudad de La Chorrera parecen indicar una prevalencia relativamente alta de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en niños (Álvarez et al., 2019). Detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en Plantas Potabilizadoras, según informes anuales de la ACP desde 2005 a la fecha reiteran que se mantiene el monitoreo de la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en las plantas potabilizadoras de Miraflores (Panamá) y Monte Esperanza (Colón), como parte del monitoreo de la calidad del agua. Por otra parte, la Autoridad de los Servicios Públicos (ASEP) y anteriormente el Ente Regulador de los Servicios Públicos en 2003, como entidad externa, tiene entre sus componentes el monitoreo de la calidad del agua desde el punto de vista biológico y asegura que en las plantas potabilizadoras de la ciudad de Panamá se vigila la presencia de cianobacterias, toxinas y protozoarios. De igual manera entre el 2003 y 2005 el laboratorio de calidad de agua del IDAAN realizó muestreos y análisis de *Giardia* spp y *Cryptosporidium* spp. en la mayoría de las Plantas Potabilizadoras del país, reportando la presencia de quistes y ooquistes en algunas de las muestras (Rivera,1991; De la Cruz,1997).

Estudios realizados en plantas potabilizadoras de comunidades aledañas a la capital por (Rivera, 1991) reportaron quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas crudas de las plantas potabilizadoras de La Chorrera, Chitré y Chepo durante la estación seca; no obstante, para la estación lluviosa los resultados en las tres plantas potabilizadoras fueron negativo. Igualmente, un estudio señala la presencia de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas crudas y tratadas de la Planta Potabilizadora de La Chorrera en la estación seca, y sólo *Cryptosporidium* spp. en aguas tratadas en estación lluviosa. En la potabilizadora de Colón se reportó la presencia de *Cryptosporidium* spp. en aguas crudas durante la estación lluviosa. Sin embargo, en la Potabilizadora de Chilibre, que abastece de agua a la mayor parte de la población urbana de la ciudad capital, no se detectó la presencia de ninguno de estos parásitos (De la Cruz et al., 1997).

1.9. Características del sitio de estudio

1.9.1. Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero

La planta potabilizadora Jaime Díaz quintero ubicada en La Chorrera, Provincia de Panamá Oeste la cual posee como punto de captación las aguas del Río Caimito, en el cual se desarrollan actividades recreacionales, ya que se utiliza como centro de balneario y actividades agrícolas como la porcicultura, también se indica que anteriormente existió un sitio de descarga de aguas negras, lo cual contribuye a la alta contaminación de esta fuente de agua. Esta potabilizadora abastece a las comunidades de: La Chorrera,

Barrio Colón, Barrio Balboa, Amador, Arosemena, El Arado, El Coco, Feuillet, Guadalupe, Herrera, Hurtado, Iturralde, La Represa, Los Díaz, Mendoza, Obaldía, Playa Leona, Puerto Caimito y Santa Rita.

La planta potabilizadora de La Chorrera fue creada para abastecer una pequeña área, pero con el paso de los años las áreas de abastecimiento fueron incrementando y consigo la necesidad de una mayor demanda del agua. De acuerdo, con información recopilada en estudios anteriores, se indicó que la misma presentaba problemas en los sistemas de filtración y sedimentación, ya que no son los adecuados, debido a que el caudal del agua es mucho mayor que la capacidad del sistema de abastecimiento de la planta, por lo que no permitía el desarrollo de un tratamiento óptimo de las aguas (De la Cruz et al., 1997).

1.9.2. Río Caimito

La cuenca del río Caimito, cuenca 140, cuenta con una extensión de 509 km² cuyo río principal es el río Caimito con una longitud de 72.83km y un perímetro de 185.75 km. Sus afluentes más importantes son: el río Aguacate con sus afluentes río Cáceres, San Bernardino y Potrero, en el Distrito de Arraiján. En el distrito de la Chorrera se tienen afluentes importantes como son: río Congo, río Caimitillo y río Martín Sánchez, en el distrito de Capira, donde tiene el nacimiento el Río Caimito, el principal afluente es el Río Caimitillo, lo demás lo constituyen quebradas de menor importancia. La cuenca ocupa gran parte de los distritos de La Chorrera, Arraiján y una pequeña porción del distrito de Capira. De los tres distritos, el de La Chorrera es el que tiene el mayor territorio, seguido del distrito de Arraiján y en menor proporción el distrito de Capira. El distrito de La Chorrera, a pesar de ocupar el mayor territorio de la cuenca del río Caimito, la población se encuentra concentrada en la ciudad de La Chorrera. Aquí los corregimientos urbanos como Barrio Colón, Balboa y el Coco poseen la más alta densidad, alcanzando cifras que superan también los 1000 habitantes por kilómetro cuadrado (Moreno et al., 2021).

1.9.3. Clima

Los elementos principales de los climas son la temperatura del aire y las lluvias. Los climas de Panamá son todos de tipo tropical, ya que el Istmo está situado en la Zona Intertropical. Son climas tropicales aquellos que tienen alta temperatura media anual. Los climas de Panamá presentan dos grandes estaciones muy marcadas:

1° La estación lluviosa (mayo – diciembre) es la estación de gran humedad, vientos débiles, días calurosos y sofocantes; muchas nubes o nubosidad, frecuentes aguaceros a mediodía (mayo – septiembre) o por las tardes y noches (septiembre – diciembre).

2° La estación seca, que dura de enero a abril. Son los días claros, despejados, con brisas suaves o fuertes que soplan desde el norte o del noroeste, cielos con poca nubosidad y muy pocas lluvias (Araúz, 2020). Panamá, país de clima tropical muy lluvioso, tiene gran cantidad de ríos. Se estima que hay cerca de 500; unos 350 en la vertiente del pacífico, mayor en la superficie que la del Mar Caribe, que sólo tiene unos 150.

Varia durante el año la cantidad de agua que lleva el río; en la estación lluviosa (mayo – diciembre) los ríos crecen, sobre todo en los meses de octubre a diciembre y algunos producen fuertes inundaciones. Durante la estación seca (Enero – Abril) llevan menos agua, y otros llegan a secarse (Biblioteca Nacional de Panamá, 2021).

La región del Pacífico se caracteriza por abundantes lluvias, de intensidad entre moderada a fuerte, acompañadas de actividad eléctrica que ocurren especialmente en horas de la tarde. La época de lluvias se inicia en firme en el mes de mayo y dura hasta noviembre, siendo los meses de septiembre y octubre los más lluviosos; dentro de esta temporada se presenta frecuentemente tropicales (depresiones, tormentas tropicales y huracanes). En Panamá existe un período seco conocido como Veranillo, entre julio y agosto. El período entre diciembre y abril corresponde a la época seca. Las máximas precipitaciones en esta región están asociadas generalmente a sistemas atmosféricos bien organizados, como las ondas y ciclones latitudes tropicales; en el resto del año las lluvias están asociadas a los sistemas atmosféricos tropicales que se desplazan sobre la Cuenca del Caribe, a la brisa marina y al calentamiento diurno de la superficie terrestre (Instituto de Meteorología e Hidrología de Panamá, 2010).

Wang et al., (2023) señala que factores como la temperatura, la lluvia, la humedad, la velocidad del viento y la radiación solar juegan un papel importante y pueden considerarse factores de riesgo o de protección para *Cryptosporidium* o *Giardia*. Las altas temperaturas pueden mejorar la supervivencia de los (oo)quistes de *Cryptosporidium*/*Giardia* y promover la progresión de la enfermedad hasta cierto punto, aunque, por el contrario, las altas temperaturas aumentan la inactivación de los (oo)quistes. Los ooquistes de *Cryptosporidium* tenían más probabilidades de sobrevivir en climas cálidos y húmedos, mientras que la inactivación por temperatura es un factor abiótico clave que afecta la supervivencia de los (oo)quistes y la infectividad en el medio ambiente.

1.9.4. Procesos de Tratamiento utilizados por la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero

Las Plantas de tratamiento de agua potable (PTAP) o Estación de tratamiento de agua potable, también conocida como (ETAP) son estructuras que mediante una serie de tratamientos físicos y químicos para eliminar contaminantes del agua de origen (Moussa,2023), que dan lugar a la transformación del agua proveniente de fuentes superficiales o subterráneas en agua apta para el consumo humano.

De acuerdo con su funcionamiento existen diferentes tipos de plantas entre ellos, las plantas de tipo convencional. Las plantas de tipo convencional se caracterizan por llevar a cabo procesos como: mezcla rápida (aplicación de coagulantes y ayudantes de coagulación), mezcla lenta (floculación), sedimentación, filtración y desinfección (Rodríguez,2024).

Las superficies externas de los ooquistes de *Cryptosporidium* y *Giardia* presentan carga negativa, similar a la de otros coloides de baja densidad con carga negativa. Por ello, un proceso de coagulación-sedimentación puede eliminarlos en cierta medida. Sin embargo, al mismo tiempo, dado que las partículas de impurezas tienen un efecto protector sobre los microorganismos patógenos, esto afecta el mecanismo de los desinfectantes y la eliminación de patógenos. Por lo tanto, la elección del tipo de coagulante, el método de filtración y el grado de turbidez del efluente se han convertido en las principales líneas de investigación (C. Feng et al., 2021)

La planta potabilizadora JDQ es de tipo convencional y posee procesos de tratamiento como floculación vertical, sedimentación lamelar y filtrado descendente.

Entre los procesos primarios de tratamiento realizados por la planta potabilizadora se encuentra la floculación (floculación vertical) en este tipo de unidades el flujo sube y baja a través de canales verticales formados por las pantallas. Este proceso es una solución ideal para plantas de medianas a grandes como es el caso de la planta Jaime Díaz Quintero, debido que a mayor profundidad se requieren estas unidades, ocupan áreas más reducidas que los canales de flujo horizontal.

Otra ventaja importante es que el área de la unidad guarda proporción con respecto a los decantadores y filtros, con lo que resultan sistemas más compactos y mejor proporcionados. En cambio, cuando se emplean floculadores de flujo horizontal en plantas grandes, el área de los floculadores es mucho mayor que el área de todas las demás unidades juntas (Organización Panamericana de la Salud, 2004).

En la planta también se emplea el proceso de decantación o sedimentación un proceso básico en cualquier tratamiento de agua, puesto que sirve para eliminar los sólidos sedimentables presentes en ésta. Constituye una parte fundamental en el proceso global de tratamiento, ya que sus errores de diseño trasladan el problema a las etapas posteriores. El papel de los decantadores en esta etapa consiste en separar los elementos semipesados y pesados en suspensión en el agua. (López et al.,2022). Por otro lado, los decantadores lamelares tienen dos propósitos fundamentales: aumentar la superficie de decantación y obtener un flujo laminar. De manera que la utilización de los decantadores lamelares se basa en el hecho de que la capacidad de retirada de sólidos de un decantador lamelar no depende de la altura del decantador, si no de su superficie.

Por ende, para la decantación secundaria se emplean principalmente decantadores lamelares a contracorriente, con conductos de tubos cuadrados o módulos hexagonales esto se debe a que los decantadores lamelares tienen un mantenimiento más complicado que los decantadores de flujo horizontal, en el proceso de fangos activos y se colocan fundamentalmente, cuando existen problemas de espacio para la implantación de la decantación secundaria (Olivares, 2021).

Por último, se lleva a cabo la filtración que es el proceso más complejo de una planta de tratamiento de agua, ya que diseño depende de la relación entre las características del agua a tratar y del medio filtrante para que se den los mecanismos de filtración adecuados con la máxima eficiencia posible. Por lo tanto, el objetivo fundamental de este proceso consiste en eliminar los sólidos en suspensión (SS) y microorganismos del agua, haciéndola pasar a través de un material filtrante. Mejora la calidad del agua coagulada, floculada y decantada, al retener posibles flóculos y partículas orgánicas e inorgánicas que hayan escapado a la decantación, disminuyendo la turbidez del efluente (López et al.,2022). La eficacia de estos procesos para erradicar *Cryptosporidium* y *Giardia*, dos parásitos protozoarios comunes transmitidos por el agua, depende de varios factores, como el tamaño del parásito, el método de tratamiento empleado y las condiciones operativas de la planta. Las investigaciones han demostrado que *Cryptosporidium* y *Giardia* se pueden eliminar eficazmente mediante ETAP convencionales que incluyen pasos de filtración y desinfección (Moussa, 2023), pero es importante tomar en cuenta el pequeño tamaño de los ooquistes puede atravesar ciertos sistemas de filtración y su extrema tolerancia al cloro hace ineficaz el tratamiento con desinfectantes químicos para el agua (Desilva et al., 2016).

1.10. *Clostridium perfringens* como posible indicador de la presencia de *Cryptosporidium* spp.

Clostridium perfringens es la especie más habitual en aguas dentro del grupo de las bacterias anaerobias sulfito-reductoras. El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden encontrarse en múltiples lugares. Por ser una bacteria esporulada tolera condiciones adversas tales como: elevadas temperaturas, desecación, pH extremos, falta de nutrientes, entre otras. Son bacterias telúricas (habitantes del suelo) ampliamente distribuidas en la naturaleza (suelo, polvo, sedimento marino, etc.) que se encuentran también en el intestino de hombres sanos, así como en ganado porcino y bovino. Pero a su vez, es patógeno para los animales (produce enterotoxemias) y para el hombre (genera toxiinfecciones alimentarias mediante *C. perfringens* tipo A y enteritis necrótica a partir de *C. perfringens* tipo C). Producen esporas excepcionalmente resistentes a las condiciones desfavorables en medios acuáticos, incluidas la radiación UV, temperatura y pH extremos, y procesos de desinfección, como la cloración. Su poder patógeno radica en la posibilidad de elaborar potentes exotoxinas de acción hemolítica, proteolítica y edematizante, en la producción de gas y en su acción necrosante sobre los tejidos. *C. perfringens* se caracteriza por ser un bacilo Grampositivo, anaerobio, inmóvil y formador de esporas ovoides subterminales y no deformantes, presentes normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. A nivel metabólico reducen nitratos a nitritos, producen H^2S (característica importante a la hora de su diferenciación en el medio de cultivo), fermentan rápidamente la lactosa y otros azúcares (con producción de ácido y gas), producen lecitinasa y elaboran toxinas de varios tipos A, B, C, D y E. La característica más importante de este grupo indicador es que sus esporos sobreviven en el agua mucho más tiempo que los coliformes y pueden ser resistentes a los tratamientos de desinfección convencional si no se realizan de manera adecuada. Los esporos son estructuras de resistencia que permiten resistir situaciones adversas que destruirían a la célula vegetativa. La estructura de un espora bacteriano incluye el núcleo, la membrana plasmática, la pared celular, el córtex y la capa esporógena interna y externa. Esta capa esporógena está formada principalmente de proteínas con pequeñas inclusiones de lípidos y carbohidratos. Estas capas les confieren resistencia frente a los agentes externos, entre ellos, los desinfectantes químicos. Por ello, su análisis después del tratamiento permite evaluar la eficacia de eliminación de agentes patógenos resistentes y cuando está presente en el agua potabilizada y desinfectada indica fallos en el tratamiento o en la desinfección.

La detección de este microorganismo en el agua inmediatamente después de su tratamiento constituye un indicador de alerta sobre el funcionamiento de la planta de filtración. Debido a su elevada resistencia, las esporas pueden indicar, de forma indirecta, la presencia de quistes de protozoarios, ya que existen referencias en la literatura científica que recomiendan a esta bacteria como indicador de contaminación fecal, incluyendo virus y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Lanao, 2012).

La presencia de cloro en el agua inactiva rápidamente bacterias indicadoras como *E. coli* y coliformes, pero deja gran parte de patógenos resistentes prácticamente sin afectar durante varias horas. Esto crea un falso sentido de seguridad al darse resultados negativos sobre coliformes y *E. coli* a las autoridades competentes responsables de los análisis microbiológicos del agua. Quistes de *Giardia* spp., ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y virus humanos entéricos son mucho más resistentes a los desinfectantes, por lo que constituyen un mayor riesgo para la salud. Cuando *E. coli* y los enterococos fecales están ausentes, la presencia de *C. perfringens* (células vegetativas y/o esporos) indica contaminación remota o intermitente debido a su longevidad y persistencia. Estudios que relacionan microorganismos patógenos con indicadores de contaminación fecal señalan a *C. perfringens* como uno de los indicadores que mejores coeficientes de correlación tiene con aquellos (Lanao, 2012).

Dada la extraordinaria resistencia de las esporas de *C. perfringens* a los procesos de desinfección y a otras condiciones ambientales desfavorables, se ha propuesto esta especie como indicador de la presencia de protozoos en los suministros de agua de consumo humano tratada. *C. perfringens* también puede utilizarse como indicador de contaminación fecal previa y, por lo tanto, puede indicar qué fuentes son susceptibles de contaminación intermitente. La evidencia de que *Clostridium* es un indicador confiable de virus entéricos es limitada e inconsistente, en gran parte se basa en un estudio de reducciones mediante el tratamiento de agua de consumo humano. Los resultados deben ser tratados con cautela, ya que la supervivencia excepcionalmente larga de sus esporas es probablemente muy superior a la de los agentes patógenos entéricos. Las esporas de *C. perfringens* son más pequeñas que los quistes u ooquistes de los protozoos, por lo que pueden ser útiles como indicadores de la eficacia de los procesos de filtración (OMS, 2011).

1.11. Importancia de *C. perfringens* en el agua para consumo humano

La presencia de *C. perfringens* en el agua de consumo humano puede ser un indicador de contaminación fecal intermitente, y debe impulsar la investigación de las posibles fuentes de contaminación. Los procesos de filtración diseñados para eliminar virus entéricos o protozoos deberían eliminar también *C. perfringens*, por lo que la detección de este microorganismo en el agua inmediatamente después de su tratamiento debería conducir a la investigación del funcionamiento de la planta de filtración (OMS, 2011)

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Descripción del Sitio de Estudio

Las muestras fueron colectadas en la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera, ubicada en el corregimiento El Trapichito, Distrito de La Chorrera, la cual se abastece del Río Caimito y se encuentra ubicada a 8° longitud Norte y 79° latitud Oeste de la provincia de Panamá Oeste.



Figura 3. Vista Satelital de la ubicación de la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero, Planta de Bombeo del IDAAN y el Río Caimito. (Google Earth, 2024).

2.1.1. Descripción de puntos de muestreo

Los puntos de muestreo corresponden al grifo de agua cruda, el canal o grifo de agua sedimentada y el grifo de agua tratada ubicados en la potabilizadora.

2.2. Colecta de las muestras

Se colectaron dos muestras por punto de muestreo durante 6 meses tanto en la época lluviosa como en la época seca, estas fueron monitoreadas mediante la toma de parámetros fisicoquímicos tales como: temperatura, conductividad, salinidad, pH, turbidez, sólidos totales disueltos y cloro residual a cada una de las muestras colectadas.

2.2.1. Volumen de muestras para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp.

Se tomaron dos muestras de 50 L para agua cruda, 2 muestras de 50 L para agua sedimentada y 2 muestras de 100 L para agua tratada, mediante un sistema de filtración colocado en los grifos *in situ*.

2.2.2. Volumen de muestras para *Clostridium perfringens*

Se recolectaron 2 muestras de 100 mL de Agua Cruda, Agua Sedimentada y Agua Tratada en envases estériles con tiosulfato al 3%.

2.3. Cadena de Almacenamiento y Transporte

Todas las muestras colectadas fueron transportadas en una hielera con pads refrigerantes a una temperatura entre 1-20°C y almacenadas a una temperatura de 1-10°C para ser posteriormente analizadas en el laboratorio de Control de Calidad de Agua del IDAAN.

2.4. Determinación de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua por la técnica de filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. De la EPA. MÉTODO ESTÁNDAR. EDICIÓN 23/ 9711 B.

La técnica de detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. descrita en este procedimiento se basan en las siguientes etapas: concentración de la muestra por filtración, centrifugación, purificación por separación inmunomagnética (IMS), tinción y lectura de láminas (microscopía de inmunofluorescencia – FA). *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. se identifican por medio del colorante DAPI (del inglés 4'-6-Diamidino-2-phenylindole). Este método identifica los géneros *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., pero no a nivel de especie. Su aplicación exige el empleo de personal capacitado con entrenamiento y experiencia en la determinación de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. por filtración, IMS y FA.

Es importante destacar que previamente a la colecta y al análisis de las muestras en el laboratorio se llevó a cabo un ensayo previo utilizando una muestra contaminada como blanco para obtener el porcentaje de recuperación indicado en el método 1623.1-2012 de la EPA utilizando agua destilada, quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp., ya que este proceso también incluye la garantía de la calidad y control de calidad (QA / QC); por lo tanto, permite verificar la calibración equipos, lista de reactivos; información para la colecta de muestras, almacenamiento, tiempos de mantenimiento y la evaluación de la capacidad del analista para procesar las muestras colectadas.

Nota: Este Método permite modificaciones siempre y cuando se hagan suficientes pruebas de equivalencia.

2.4.1. Criterios de Aceptación

Criterios de rendimiento aceptables para la eficiente recuperación en muestras de prueba de la matriz son 13-111% para *Cryptosporidium* spp. y de 15 a 118% de *Giardia* spp. la aceptación revisa criterios de precisión en curso y las muestras de recuperación (OPR) (Agua reactiva enriquecida) son de 22 a 100% de *Cryptosporidium* spp. 11 y 14 a 100% para *Giardia* spp.

2.4.2. Concentración inicial de la muestra

Para la recolección de la muestra se utilizaron filtros Envirochek HV los cuales poseen una membrana polietersulfona plisada; estos filtros de (alto volumen) tienen una cápsula con una membrana de poliéster. El Método 1623.1-EPA requiere al menos 10 L de agua superficial no tratada para el análisis, aunque dependiendo de la turbidez de la muestra, se puede necesitar más de un filtro. Los filtros Envirochek HV se pueden utilizar hasta un máximo de 50 L de las aguas superficiales y de 100 hasta 1000 litros de agua tratada. Por lo tanto, los analistas evalúan típicamente grandes volúmenes de agua tratada (Hasta 1000 L).

Para efecto del agua cruda y sedimentada se filtraron 50 litros en campo y 100 litros de agua tratada a la cual se le neutralizó el cloro residual mediante la adición de 2% (p/v) de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) y posteriormente se colectó de un grifo a presión o por medio de una bomba en caso de que no se tuviese un grifo a presión disponible, de manera que los caudales podían variar en un rango de 0,7 L / min (tiempo de funcionamiento total por aproximadamente 24 h para la muestra de 1000 L) o 4 L / min (tiempo total de funcionamiento aproximadamente 4,2 h). El caudal a través del filtro no debe exceder de 2 litros/min para los filtros Envirocheck HV. El volumen filtrado debe medirse a través de un totalizador de flujo o un carboy graduado a 0,25-L. Toda la manguera debe ser nueva o esterilizada por una solución de jabón/cloro, enjuagar a fondo, y autoclavar la misma.

Nota: No exceda de 30 lb / plg 2 o 4 L / min.

Adicionalmente se colectó el 10% del total de muestras al azar en bombonas o tanques estériles y transportaron al laboratorio de calidad de agua del IDAAN para su análisis. La temperatura de la muestra debe mantenerse de 1-10 ° C durante el almacenamiento y entre

1 y 20 ° C durante el transporte. Es importante garantizar que se mantenga la temperatura de la muestra durante transporte y almacenamiento a través de dispositivos calibrados (por ejemplo, un termómetro vial, tira adhesiva de temperatura, termómetros infrarrojos, o con temperatura de Grabación Thermochron butrón).

2.4.3. Tiempo máximo admisible para el procesamiento de la muestra en cada paso.

Tabla 3. Tiempos De Almacenamiento Del Método

Descripción	Días	Horas
Recogida / filtración y elución.	4 días	(96 horas)
Elución y aplicación de la muestra al portaobjeto.	1 día	Un día de Trabajo
Aplicación al portaobjeto y la tinción	3 días	(72 horas)
Tinción y examen al microscopio	7 días	(168 horas)

Nota: Previamente a la colecta de las muestras se deben esterilizar los materiales a utilizar y de igual manera se debe realizar la preparación de los reactivos requeridos.

Nota: Es importante recalcar que se debe completar la elución, concentración y purificación en una sola jornada laboral. Es fundamental que estos pasos se completen en una sola jornada laboral para minimizar el tiempo en el que los organismos objetivo-presentes en la muestra permanezcan en el eluido o la matriz concentrada. Este proceso finaliza con la aplicación de la muestra purificada en el portaobjetos para su secado.

2.4.4. Dispersión de la muestra

Llegadas las muestras al laboratorio fueron almacenadas para su posterior análisis.

Se tomó en cuenta previamente al proceso de elución que este puede requerir hasta 275 ml de tampón por muestra.

Como primer paso retiramos las tapas de entrada de los filtros, vertiendo la solución de NaHMP por la abertura de entrada y dejando que el nivel del líquido se estabilizara. Se agrego suficiente solución de NaHMP cubriendo aproximadamente 1 cm por encima del pliegue de la membrana del filtro con la solución de NaHMP, midiendo la solución de NaHMP hasta 125 mL y colocamos nuevamente la tapa de entrada.

Se sujeto firmemente la cápsula en una de las abrazaderas del agitador de laboratorio, con la válvula de purga en la parte superior, sobre un eje vertical (en la posición 12 de acuerdo con las manecillas del reloj). Luego se encendió el agitador y se ajustó la velocidad al

máximo (700-900 rpm o según las instrucciones del fabricante). Se agito la cápsula durante aproximadamente 5 minutos.

El filtro fue retirado del agitador, al igual que la tapa de salida y se conectó la salida del filtro a una manguera, a un nivel más arriba que la bomba. Con el filtro en posición vertical, se retiró la tapa de entrada, teniendo cuidado de no verter líquido por la entrada. Se encendió la bomba y se dejó que se absorbiera todo el NaHMP a través del filtro. Apagamos la bomba para evitar que los pliegues del filtro se colapsen durante el bombeo. Llenamos la cápsula con agua reactiva, presionando la manguera de salida, para cubrir la membrana blanca plisada y el plástico que la recubre; dejando que el nivel de líquido se estabilizara. Se agrego suficiente agua reactiva para cubrir la membrana blanca plisada y posteriormente se encendió la bomba y se dejó drenar toda el agua a través del filtro. Se coloca nuevamente la tapa de entrada y se procedió a desconectar el tubo de salida del filtro y se volvió a colocar la tapa de salida.

Nota: Inmediatamente después de realizar esta etapa se debe proceder a la elución el mismo día.

2.4.5. Elución

Para el proceso de elución primero se colocó la cápsula en posición vertical con el extremo de entrada hacia arriba.

Luego se retiró la tapa de entrada vertiendo el tampón de elución para cubrir la membrana plegada con la solución, o bien puede medirse el tampón de elución para asegurar el uso de un tubo de centrifuga de 250 ml y por último se coloca nuevamente la tapa de entrada. Se sujeto firmemente la cápsula en una de las abrazaderas del agitador de laboratorio, con la válvula de purga en la parte superior, sobre un eje vertical (en la posición 12 de acuerdo con las manecillas del reloj). Luego se encendió el agitador y se ajustó la velocidad al máximo (700-900 rpm o según las instrucciones del fabricante). Se agito la cápsula durante aproximadamente 5 minutos.

Retiramos los filtros del agitador, removemos la tapa de entrada y vertimos el contenido de la cápsula en un tubo de centrifuga de 250 ml.

Sujete la cápsula verticalmente con el extremo de entrada hacia arriba y añada suficiente volumen de tampón de elución a través del conector de entrada para cubrir la membrana plisada. Vuelva a colocar el tapón de entrada.

Regresamos la cápsula al agitador con la válvula de purga en la posición de las 4 en punto.

Se encendió el agitador y se agitó la cápsula durante aproximadamente 5 minutos, dejamos el tampón de elución en la cápsula y luego se alineo nuevamente en el agitador con la válvula de purga en la posición de las 8 y dejamos agitar durante 5 minutos más. Retiramos el filtro del agitador, removemos la tapa de entrada y vertimos el contenido en el tubo de centrifuga de 250 mL. Posteriormente se enjuago en interior de las paredes del filtro de la cápsula con agua destilada o tampón de elución utilizando un policial o una pipeta serológica insertada en el extremo de entrada de la cápsula, después invertimos el filtro de la cápsula sobre el tubo de centrifuga asegurándonos de que se haya transferido la mayor cantidad posible de eluido y volvemos a colocar el tampón de entrada. Balanceamos la cápsula del filtro manualmente a una inclinación de 180° para recuperar más eluido del filtro.

2.4.6. Concentración y Separación de muestras (Purificación)

Para este paso concentramos el eluido mediante centrifugación, y los ooquistes y quistes de las muestras fueron separados de otras partículas mediante IMS. De manera que equilibramos los tubos con una diferencia de 0,5 g entre sí antes de la centrifugación o utilizamos un rotor autoequilibrado y luego centrifugamos el tubo de 250 mL que contiene el eluido a un mínimo de 1500 x G por 15 minutos, esperamos a que la centrifuga se detuviera, sin utilizar el freno y registramos el volumen de pellet (volumen de sólidos). Posterior a la centrifugación se procedió a recolectar un volumen de sedimento empacado que debe ser $\leq 0,5$ mL, utilizamos una pipeta para aspirar cuidadosamente el sobrenadante a 5 mL por encima del sedimento, también se aspiró en la interfaz aire/agua desde el centro del tubo utilizando una presión suave y constante y reducimos la presión de vacío cuando quedaban 30 mL de sobrenadante. Se debe tener cuidado para evitar la aspiración de los ooquistes y quistes durante esta etapa.

Nota: Las recuperaciones se pueden mejorar si la aspiración se realiza con una pipeta Pasteur o una pipeta serológica con un diámetro interno de 1,2 a 1,5 mm.

Se agitó vigorosamente el tubo durante 10-15 segundos y mezclamos con una pipeta hasta que el sedimento este completamente resuspendido, luego agitamos suavemente el tubo de centrifuga para reducir la formación de espuma después de agitarlo.

Nota: Se debe tener cuidado con las muestras que contienen arena u otro material arenoso cuando se agita en el vórtex para garantizar que la condición de cualquier quiste u ooquiste en la muestra se vea comprometido.

2.4.7. Separación Inmunomagnética (IMS)

Nota: El procedimiento IMS debe realizarse con muestras y búferes IMS a temperatura ambiente, que van desde 15°C a 25°C.

Inicialmente preparamos una dilución 1X de SL-buffer-A del 10X SL-buffer-A solución suministrada. Utilizamos agua destilada como diluyente y para cada 1 mL de 1X SL-buffer-A requerido, mezclamos 100 µL de 10X SL-buffer-A y 0.9 mL de agua destilada como diluyente. Preparamos un volumen de 1.5 mL de 1X SL-buffer-A por muestra y a cada tubo L10 agregamos 1 mL de 1X SL-buffer-A suministrado no diluido y 1 mL de 10X SL-Buffer-B solución suministrada al tubo L10 que contenía la solución antes agregada.

2.4.8. Captura de quistes y ooquistes

Utilizamos una pipeta graduada de 5 o 10 mL previamente enjuagada con tampón de elución, se midió y transfirió el concentrado de muestra a los tubos L10 que contenían los buffers SL. Cuando trasparamos la muestra se realizó un enjuague del tubo de centrifuga dos veces con agua destilada y lo agregamos a los tubos L10 los cuales deben tener un volumen total 12 mL incluyendo el volumen de los buffers SL.

Seguido de este proceso agitamos en un vortex el vial Dynabeads®Crypto-Combo del-6 kit IMS durante aproximadamente 10 segundos para resuspender las perlas. Asegurándonos de que las perlas estén completamente resuspendidas inclinando el tubo y observando que no haya pellet residual en la parte inferior. Después agregamos 100 µL de Dynabeads®Crypto-Combo resuspendido a los tubos L10 que contienen la muestra.

Nota: Se realiza el mismo procedimiento para agregar a los tubos L10 el vial con Dynabeads®Giardia-Combo.

Luego de añadir las perlas inmunomagnética se llevaron los tubos L10 a un mezclador giratorio y se configuró a 18 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente, después de rotar durante 1 hora retiramos los tubos L10 con la muestra del mezclador y lo colocamos en el concentrador de partículas magnéticas (MPC®-6 con el lado plano del tubo hacia el imán. Nos aseguramos de que el tubo este ajustado hacia el imán y agitamos suavemente el tubo de muestra con la mano en cada extremo del MPC®-6 a 180° inclinándolo hacia arriba y hacia abajo el extremo de la tapa y el extremo de la base del tubo, realizamos este movimiento durante 2 minutos con aproximadamente una inclinación por segundo.

Nota: Se debe mantener la muestra inclinada durante este paso para evitar la unión del material magnético, ya que la muestra solo puede permanecer inmóvil en el MPC®-6 durante 10 segundos.

Retiramos los tubos L10 del MPC®-6 y luego volvimos a resuspender suavemente todo el material, lo colocamos nuevamente en el MPC®-6 en posición vertical con la tapa en la parte superior, le retiramos inmediatamente la tapa y mantuvimos el lado plano del tubo en la parte superior, después vertimos el sobrenadante del tubo con una pipeta Pasteur evitando agitar y quitar el tubo del MPC®-6 durante este paso. Utilizando un pañuelo limpio sin pelusa secamos el extremo en el MPC®-6 y decantamos el sobrenadante de 1 a 3 tubos L10 a la vez, por último, movimos cada lado en un ángulo de 90° 3 veces antes de decantar los tubos restantes.

En el siguiente paso retiramos el tubo L10 del MPC®-6 y resuspendimos la muestra en 0,5 mL de tampón SLX-1-A y agregamos directamente al lado plano del tubo 1X SL Buffer A evitando que cualquier residuo se fuera al lado redondo del tubo. Mezclamos muy suavemente utilizando una pipeta de 1,0 mL para resuspender el sedimento de perlas en el tubo y soltamos el líquido por el lado plano del tubo para enjuagarlo.

Después de enjuagar el tubo, colocamos los tubos de microcentrífuga de 1,5 mL en el concentrador de partículas magnéticas MPC®-S con la banda magnética en posición vertical (posterior). Transferimos el contenido del tubo L10 a los tubos de microcentrífuga enjuagando el tubo L10 dos veces para garantizar que se transfirió todo el líquido de muestra al tubo de microcentrífuga de 1,5 mL en el MPC®-S. Utilizamos 0.5 mL de 1X SL-buffer A para realizar el primer enjuague y 0,5 mL de 1X SL-buffer-A para el segundo enjuague y mezclamos cada enjuague suavemente usando una pipeta de 1,0 mL y soltando el líquido por el lado plano del tubo para enjuagarlo mejor evitando transferir los desechos presentes en el lado redondo del tubo, permitiendo que la muestra se asiente durante mínimo 1 minuto después de la transferencia del segundo volumen de enjuague, luego usamos una pipeta para recoger cualquier volumen residual que gotee hasta el fondo del tubo asegurándonos que se transfiriera todo el líquido y las perlas.

Sin retirar el tubo de microcentrífuga del MPC®-S balanceamos suavemente el tubo a 180° con las manos durante 1 minuto con aproximadamente un giro de 180° por segundo y el imán se balancea a 180° por segundo en una dirección y luego lo balanceamos hacia atrás en el siguiente segundo, de manera que al final de este paso las perlas produjeron un color marrón distintivo en la parte posterior del tubo, sin embargo, si el punto marrón no

fuese visible se debe verificar la ubicación del imán del tubo de microcentrífuga en el MPC®-S para garantizar que se hayan ensamblado correctamente y repetimos el paso. Luego aspiramos inmediatamente el sobrenadante del tubo, manteniéndolos en el MPC®-S, en este caso como se procesó más de una muestra se realizaron 3 movimientos rock/roll de 90° antes de eliminar el sobrenadante de cada tubo, teniendo cuidado de no alterar el material adherido a la pared del tubo adyacente al imán, evitando sacudir y retirar el tubo del MPC®-S durante este paso. Enjuagamos las perlas dentro del tubo de microcentrífuga manteniendo el tubo en el MPC®-S y agregamos suavemente 1.0 mL de 1X PBS teniendo cuidado de no alterar el granulado adherido a la pared del tubo adyacente al imán, posteriormente retiramos el MPC®-S y balanceamos suavemente la muestra de 8-10 veces a 180° hasta que las perlas se volvieran a suspender y reemplazamos la banda magnética en la posición vertical (posterior) en el MPC®-S.

Volvimos a realizar los siguientes pasos: retiramos el tubo de microcentrífuga del MPC®-S balanceamos suavemente el tubo a 180° con las manos durante 1 minuto con aproximadamente un giro de 180° por segundo y el imán se balancea a 180° por segundo en una dirección y luego lo balanceamos hacia atrás en el siguiente segundo, de manera que al final de este paso las perlas produjeron un color marrón distintivo en la parte posterior del tubo, sin embargo, si el punto marrón no fuese visible se debe verificar la ubicación del imán del tubo de microcentrífuga en el MPC®-S para garantizar que se hayan ensamblado correctamente y repetimos el paso.

Luego aspiramos nuevamente el sobrenadante del tubo, manteniéndolos en el MPC®-S, en este caso como se procesó más de una muestra se realizaron 3 movimientos rock/roll de 90° antes de eliminar el sobrenadante de cada tubo, teniendo cuidado de no alterar el material adherido a la pared del tubo adyacente al imán, evitando sacudir y retirar el tubo del MPC®-S durante este paso.

Luego de repetir los pasos anteriores, dejamos que el tubo permaneciera inalterado durante 1 minuto, permitiendo que cualquier líquido residual fluya al fondo del tubo utilizando una pipeta Pasteur y mezclamos suavemente el líquido con el sedimento residual y lo aspiramos sin sacudir el tubo ni retirarlo del MPC®-S mientras llevamos a cabo estos pasos.

2.4.9. Disociación del complejo perlas/quistes y ooquistes

Removimos la banda magnética de MPC®-S, adicionamos 50 µL de HCl 0,1 N a cada tubo, después agitamos durante 50 segundos con el vortex a velocidad alta y luego

dejamos el tubo en reposo en posición vertical, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agitó vigorosamente nuevamente durante 30 segundos hasta asegurarnos que la muestra entera se encontraba en la base del tubo. Volvimos a colocar la banda magnética en MPC®-S en la posición inclinada y lo dejamos durante 10 segundos.

Preparamos un portaobjeto para la selección de muestras y los etiquetamos, luego adicionamos 5 µL de NaOH a dos pocillos de muestra en un portaobjetos (máximo 10 µL a cada pocillo), sin remover el tubo de microcentrífuga del MPC®-S transferimos la muestra entera del tubo a un portaobjeto que contenía 10 µL de NaOH, teniendo cuidado de no perturbar el pellet o sedimento de las perlas en la parte posterior del tubo y asegurándonos de que todo el líquido fuese transferido.

Sin desechar las perlas del tubo de microcentrífuga después de haber transferido el volumen desde la primera disociación ácida al pocillo del portaobjetos y realizamos nuevamente los pasos anteriores para realizar una segunda disociación.

Registramos la hora y fecha en la cual realizamos la aplicación de la muestra purificada al portaobjetos y la dejamos secar al aire en los pocillos del portaobjeto aproximadamente entre 15-30 minutos, tomando en cuenta la variación de temperatura y humedad del laboratorio. Sin embargo, nos aseguramos de que la muestra se hubiese secado completamente para poder realizar la tinción de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.4.10. Tinción de las muestras con el Kit directo para G/C Aqua-Glo completo

Nota: Se debe realizar la tinción, dentro de las 72 horas de la aplicación de la muestra purificada en el portaobjeto.

En este punto, realizamos una fijación con metanol; sin embargo, no es necesaria para que este reactivo se adhiera bien a los quistes y ooquistes. La fijación con metanol puede intensificar la tinción con DAPI. Aplicamos 45 µL de metanol absoluto al pocillo del portaobjeto y lo dejamos que se seque completamente. (Tiempo de secado: aproximadamente 30 minutos).

Una vez que la muestra estaba completamente seca, procedimos a realizar la tinción con DAPI, añadiendo 50 µL de una dilución de trabajo (1X) de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a cada pocillo de muestra, dejando reposar la muestra durante 1 minuto a temperatura ambiente. Enjuagamos el portaobjetos para eliminar el DAPI añadiendo de 50 a 100 µL de tampón de lavado SureRinse™ y lo dejamos actuar durante 1 minuto. Después inclinamos el portaobjeto con el borde largo hacia abajo y absorbimos el exceso

de líquido con un papel absorbente colocado en el borde del pocillo sin tocar la superficie para no alterar la muestra.

Aplicamos una gota (aproximadamente 45 μL) de reactivo de anticuerpos Aqua-Glo™ G/C en cada pocillo y extendimos la gota con un aplicador o una varilla de vidrio, evitando que tocara la superficie del portaobjeto, posteriormente lo incubamos en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante al menos 25 minutos o en una incubadora a 37 °C, igualmente durante 25 minutos, tomando en cuenta que se permiten periodos de incubación más largos. En el siguiente paso enjuagamos el portaobjeto para eliminar el reactivo de anticuerpos añadiendo 50-100 μL de tampón de lavado SureRinse™ o equivalente, y dejamos que actuara durante 1 minuto e inclinamos el portaobjeto, con el borde largo hacia abajo, y absorbimos el exceso de líquido con papel absorbente colocado en el borde del pocillo sin tocar la superficie para no alterar la muestra.

En esta etapa, se de acuerdo con las instrucciones del kit se puede reducir la fluorescencia de fondo inespecífica añadiendo un fondo rojizo para mejorar el contraste mediante el uso la tinción de contraste BlockOut™ de manera que aplicamos una gota de tinción de contraste por pocillo y después incubamos durante 1 minuto a temperatura ambiente, enjuague el portaobjeto para eliminar la tinción de contraste y añadimos 50-100 μL de tampón de lavado SureRinse™ o equivalente, lo dejamos actuar durante 1 minuto más y se inclinó el portaobjeto, con el borde largo hacia abajo, y absorbimos el exceso de líquido con papel absorbente colocándolo en el borde del pocillo sin tocar la superficie del pocillo para no alterar la muestra, dejamos secar el portaobjeto parcial o completamente al aire en un soporte inclinado para posteriormente montarlo con una gota (~45 μL) de medio del montaje No-Fade™ y por ultimo le colocamos un cubreobjeto y lo observamos al microscopio.

Nota: En caso de que las muestras no sean examinadas inmediatamente, se debe guardar en una cámara húmeda en un lugar oscuro entre 1-10°C hasta que estas sean utilizadas.

2.4.11. Preparación del control positivo y negativo

Para el control positivo, pipeteamos 10 μL de antígeno positivo en el pocillo del portaobjeto y para el control negativo pipeteamos 50 μL de PBS en el centro de un pocillo del portaobjeto respectivamente y ambos los extendimos sobre el área utilizando puntas de micropipeta, posteriormente los dejamos secar al aire al mismo tiempo en los pocillos del portaobjeto aproximadamente entre 15-30 minutos, tomando en cuenta la variación de temperatura y humedad del laboratorio. Sin embargo, nos aseguramos de que la

muestra se hubiese secado completamente para poder realizar la tinción de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se describe en el punto **2.4.10. Tinción de las muestras con el Kit directo para G/C Aqua-Glo completo.**

2.4.12. Examinación de la muestra

La técnica de escaneo de las muestras se llevó a cabo de manera sistemática con cada pocillo utilizando un patrón de lectura de arriba hacia abajo, de abajo hacia arriba o de lado a lado con un aumento mínimo de 200X para el examen FITC y para el examen DAPI un mínimo de 400X.

Para examen FITC utilizamos epifluorescencia para escanear todo el pocillo en busca de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. los cuales deben observarse de forma esférica ovoide brillante de 4 a 6 μm de diámetro con bordes resaltados brillantemente, para *Giardia* spp. Se deben observar quistes brillantes de color verde manzana redondos de 8 a 18 μm de largo y de 5 a 15 μm de ancho con bordes resaltados brillantes.

2.5. Detección de *Clostridium perfringens* por el método ISO 14189:2013

Metodología establecida en la Norma ISO 14189:2013 para la enumeración de *Clostridium perfringens*, empleando el método de Filtración por Membrana (Rodríguez, 2016).

2.5.1. Preparación de materiales

Se esterilizaron los insumos previamente a su uso (cristalería, platos petri, etc.) Luego se prepararon los medios de cultivos (Agar TSC + cicloserina) (Agar Columbia), según las instrucciones del fabricante.

2.5.1.1. Preparación de medios de cultivo

- **Agar TSC (Tryptosa Sulfito Cicloserina) (base): MERCK**

Para la preparación de agar TSC (Tryptosa Sulfito Cicloserina), se disolvieron 39 g en 1 L de agua purificada., después se calentó el agua hasta que estuviese hirviendo y agitamos frecuentemente hasta su completa disolución. Luego se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Posterior al proceso de esterilización, cuando el agar este a una temperatura de 44 °C a 47 °C, mezclamos 10 ml de una solución de D-cicloserina al 4 % esterilizada

por filtración, n.º de cat. C6880 o C30020, para obtener una concentración final de cicloserina de 0,4 g por litro de agar TSC.

Nota: Según la norma EN ISO 14189:2013, las placas de agar TSC preparadas por el usuario deben utilizarse lo más frescas posible el mismo día. Si es inevitable almacenar las placas preparadas, pueden conservarse en condiciones anaeróbicas a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ hasta siete días.

Las placas deben desecharse una vez sacadas del refrigerador si no se utilizan. No deben volver a almacenarse, ya que el rendimiento del medio se deteriora. Las placas deben secarse bien antes de su uso, según la norma EN ISO 11133.

- **Agar Columbia: SIGMA ALDRICH**

Se disolvieron 42 g en 1 litro de agua destilada. Esterilizamos en el autoclave a $121 ^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Esperamos que se enfríe a $50 ^\circ\text{C}$ y añadimos los componentes sensibles al calor.

Por último, incubamos a $35 ^\circ\text{C}$ en condiciones anaeróbicas.

Nota: Conserve el medio preparado a menos de $8 ^\circ\text{C}$, protegido de la luz directa. No utilice el medio preparado si presenta signos de contaminación o deterioro (encogimiento, agrietamiento, evaporación o decoloración). Conservar el polvo deshidratado en un lugar seco, en recipientes bien cerrados a $2-25^\circ\text{C}$.

2.5.2. Procedimiento: Filtración por membrana

Previamente a la filtración se sumergieron las muestras en un baño precalentado a $60 ^\circ\text{C}$ por al menos 15 minutos para destruir la estructura vegetativa de la bacteria y conservar sus esporas.

Antes de proseguir al siguiente paso armamos el sistema de filtración al vacío, ya previamente esterilizado.

Nota: Este debe armarse con precaución para evitar la contaminación del sistema de filtración.

Luego se colocaron los filtros en el sistema con cuidado y se ajustan con la pinza que sostiene el sistema.

Posteriormente se procedió a filtrar las muestras de 100 ml de agua cruda, agua sedimentada y agua tratada con sus respectivas réplicas y se colocaron los filtros de $0.45\mu\text{m}$ y diámetro de 47 mm en un plato petri de 50 mm con agar TSC + cicloserina ya listos para usar y finalmente se llevaron a incubar los cultivos en anaerobiosis a $44\pm 1^\circ\text{C}$ durante 21 ± 3 horas.

Nota: En caso de que la muestra posea una alta concentración de materia orgánica o sedimento, realizar diluciones para mejores resultados.

Luego de concluir la primera fase de incubación seleccionamos 10 colonias con características típicas de *C. perfringens* y las cultivamos en agar Columbia a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas en anaerobiosis, después transferimos las colonias a papel filtro y adicionamos el reactivo de fosfatasa ácida para observar la confirmación de las colonias. Por último, se reportó el número total de colonias confirmadas como UFC de *C. perfringens*/100ml.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

RESULTADOS

El muestreo realizado para la detección de *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens*, se realizó durante seis meses del año de los cuales tres correspondían a la época lluviosa y tres a la época seca. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de chi-cuadrado la cual no mostró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens* asociados a una de las épocas del año en específico, ya que los valores de p en cada una de las épocas fueron >0.05.

De acuerdo con una evaluación independiente de los resultados por protozoo y época del año se identificó una mayor detección de *Giardia* spp durante la época seca como se indica en la (Tabla 4.).

A diferencia de los resultados observados para *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens* fueron detectados en la misma frecuencia durante las dos épocas del año como se indica en la (Tabla 5.).

Tabla 4. Presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. durante la época lluviosa y la época seca.

	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	Total
Época lluviosa	2	4	6
Época seca	4	16	20
Total	6	20	26

Nota. En esta tabla se puede observar la frecuencia con la que aparece *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. durante la época seca y la época lluviosa.

Tabla 5. Presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* durante la época lluviosa y la época seca.

	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>	Total
Época lluviosa	2	3	5
Época seca	4	1	5
Total	6	4	10

Nota. En esta tabla se puede observar la frecuencia con la que aparecen *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens* durante la época seca y la época lluviosa.

Evaluación de la asociación de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* en matrices de agua potable, sedimentada y cruda.

De acuerdo con los procesos de tratamiento realizados por la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera se seleccionaron tres matrices de agua para la evaluación de la presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens* para cada una respectivamente.

Para cada una de las matrices agua tratada, sedimentada y cruda se recolecto una muestra y una réplica durante la época seca y lluviosa. Durante la época seca se colectaron 6 muestras de agua tratada, 6 de agua sedimentada y 6 de agua cruda, de las cuales resultaron positivas en un 16,6% para *Cryptosporidium* spp. en agua sedimentada y 50% para agua cruda, en el caso de *Clostridium perfringens* solo se detectaron un 16,6% de muestras positivas en agua cruda. De igual manera se colectaron durante la época lluviosa 6 muestras de cada matriz y se detectó un 16,6% para *Cryptosporidium* spp. en agua sedimentada y 16,6% para agua cruda, para *Clostridium perfringens* se reportó un 33.3% en agua sedimentada y un 100% en agua cruda.

Según los datos reportados durante la época seca y lluviosa se pudo observar que todas las muestras de agua tratada fueron negativas y que la matriz con mayor porcentaje de recuperación tanto de *Cryptosporidium* spp. como de *Clostridium perfringens* es la de agua cruda, ya que en esta se puede encontrar una mayor concentración de microorganismos debido a que aún no ha completado su proceso de tratamiento, sin embargo es importante destacar que el agua cruda colectada ya ha pasado por un proceso de precloración en el cual se le adiciona una cantidad promedio de 4.8 Kg/h de cloro y aun así se detectó un alto porcentaje de *Clostridium perfringens*, lo que indica una posible contaminación de la fuente de captación de agua reportando mayor aumento de los niveles durante los meses de correspondientes a la época lluviosa (Ligda et al., 2020).

Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens*.

Tabla 6. Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* en agua tratada y agua sedimentada.

	Agua tratada	Agua sedimentada	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1	1
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0
Total	0	1	1

Nota. Los datos expresados en esta tabla proporcionan la cantidad de veces en las que detectaron cambios en la presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* respecto a la matriz de agua tratada y agua sedimentada.

Tabla 7. Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* en agua tratada y agua cruda.

	Agua tratada	Agua cruda	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	5	5
<i>Clostridium perfringens</i>	0	4	4
Total	0	9	9

Nota. Los datos expresados en esta tabla proporcionan la cantidad de veces en las que podemos detectar cómo varía la presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* respecto a la matriz de agua tratada y cruda.

Tabla 8. Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* en agua sedimentada y agua cruda.

	Agua sedimentada	Agua cruda	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	5	6
<i>Clostridium perfringens</i>	0	4	4
Total	1	9	10

Nota. En esta tabla se puede observar la variación de la presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Clostridium perfringens* en el agua sedimentada y cruda respecto a las tablas anteriores donde se presenta la matriz de agua tratada.

La detección de *Cryptosporidium* spp. se realizó mediante el método de análisis de Determinación de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua por la técnica de filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. De la EPA y para la evaluación de *Clostridium perfringens* como indicador asociado a la presencia de *Cryptosporidium* spp, se realizó a través del método de análisis 14189:2013 para la enumeración de *Clostridium perfringens* de la Norma ISO.

Según los resultados obtenidos, no se encontró una asociación significativa entre la presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens*. Esto se mantuvo constante independientemente de las variables consideradas en el estudio, como la época del año y la matriz de agua colectada. El análisis estadístico realizado mediante la prueba de chi-cuadrado no mostró una relación estadísticamente significativa entre estos dos microorganismos, ya que los valores de p en cada una de las tablas fueron >0.05.

Detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en matrices de agua potable, sedimentada y cruda.

La detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., se llevó a cabo mediante el análisis Determinación de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua por la técnica de filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. De la EPA.

En general los parásitos *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. se encuentran juntos en el agua debido a que la fuente de ooquistes y quistes incluyen las aguas servidas de origen humano y heces de muchas especies de mamíferos y reptiles (Cermeño et al., 1997). De acuerdo con los datos arrojados durante la fase experimental se detectó la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua sedimentada y cruda de la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero tal y como se indica en la (Tabla 10).

Mediante el análisis de los datos obtenidos, no se encontró una relación significativa entre la presencia o ausencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. entre sí, ni tampoco con las matrices de agua de agua analizadas (Figura 7). Dado que se mantuvieron constantes las variables consideradas en el estudio como: la época del año (seca y lluviosa) y las matrices de agua colectada (tratada, sedimentada y cruda). Por lo tanto, el análisis estadístico realizado mediante la prueba de chi-cuadrado confirma que no hay una relación estadísticamente significativa entre estos dos microorganismos, ya que los valores de p en cada una de las tablas fueron >0.05.

Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp.

Tabla 9. Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. en agua tratada y agua sedimentada.

	Agua tratada	Agua sedimentada	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1	7
<i>Giardia</i> spp.	0	6	6
Total	0	7	7

Nota. Los datos expresados en esta tabla proporcionan la cantidad de veces en las que detectaron cambios en la presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. respecto a la matriz de agua tratada y agua sedimentada.

Tabla 10. Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. en agua tratada y agua cruda.

	Agua tratada	Agua cruda	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	5	5
<i>Giardia</i> spp.	0	16	16
Total	0	21	21

Nota. Los datos expresados en esta tabla proporcionan la cantidad de veces en las que podemos detectar cómo varía la presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. respecto a la matriz de agua tratada y cruda.

Tabla 11. Resultados de la detección de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. en agua sedimentada y agua cruda.

	Agua sedimentada	Agua cruda	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	5	6
<i>Giardia</i> spp.	4	16	20
Total	5	21	26

Nota. En esta tabla se puede observar la variación de la presencia de *Cryptosporidium* spp. vs *Giardia* spp. en el agua sedimentada y cruda respecto a las tablas anteriores donde se presenta la matriz de agua tratada.

Conforme a los resultados obtenidos y en relación con los objetivos planteados, se determinó la presencia de los parásitos *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. específicamente en el agua cruda y sedimentada, pero no en el agua tratada. De acuerdo con un estudio realizado por Payment y Franco (1993), también se detectaron ambos parásitos, *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., en el agua cruda y sedimentada. Sin embargo, dichos parásitos estuvieron ausentes en las muestras de agua tratada. Cabe destacar que según los datos recopilados en este estudio se determinó de la asociación de *Clostridium perfringens* como un posible indicador de la presencia de *Cryptosporidium* spp., no obtuvo una diferencia significativa para ninguna de las matrices de agua colectadas. Por otra parte, el estudio de (Payment & Franco, 1993), indica que, en el agua cruda, la densidad de *Clostridium perfringens* fue el único parámetro que se correlacionó significativamente con la presencia quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp., de manera que no hubo una asociación con los quistes y ooquistes detectados en el agua sedimentada y en el agua tratada, En esta investigación no se pudo realizar un análisis estadístico de correlación debido a que todas las muestras para agua tratada de este estudio fueron negativas tanto para parásitos, como para los indicadores seleccionados. Por último, en función de las hipótesis planteadas al inicio de esta investigación, podemos concluir, mediante el análisis estadístico de Chi cuadrado ($P > 0,05$), que no hay presencia de *Clostridium perfringens* asociada a la detección de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, ya que está relacionada con la variación aleatoria de los protozoos entéricos y *Clostridium perfringens* en los afluentes de agua, causada por factores ambientales y antropogénicos.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la época seca y lluviosa se detectó una mayor recuperación durante de la época seca de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. En cambio la presencia de *Clostridium perfringens* durante la época seca fue menor a la de *Cryptosporidium* spp. a pesar de que la comparación de la presencia de ambos tipos de microorganismos es independiente de la época del año. Un estudio realizado por Fradette et al., (2024) y (Xiao et al., 2018) evidenciaron fuertes correlaciones, tanto positivas como negativas entre *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. con diversas variables de precipitación que sugieren que estos dos protozoos se ven afectados por el fenómeno de dilución o lixiviación. Las correlaciones negativas sugieren que los (oo)quistes se diluyen en el agua, mientras que las correlaciones positivas tienden a indicar la lixiviación del terreno por escorrentía y otros factores como la turbidez.

Se determinó mediante la comparación de la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. que estos fueron más prevalentes durante la época seca. Un estudio realizado por De la Cruz et al., (1997) indica una gran incidencia de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la planta potabilizadora de Chorrera, en tres matrices de agua analizadas durante la época seca y lluviosa, reportando la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua cruda y tratada de la planta potabilizadora de Chorrera. De acuerdo con De la Cruz et al., (1997) la presencia de estos protozoos está correlacionada a algunos parámetros físicoquímicos tales como la alta turbiedad, ya que de acuerdo con (Wang et al., 2023) los factores ambientales pueden influirse entre sí de manera que en el río Trapichito, donde se encuentra la toma de captación del agua cruda de la planta potabilizadora de Jaime Díaz Quintero de la Chorrera.

La investigación realizada por Ligda et al., (2020) donde las mediciones de turbidez fueron mayores durante los meses de lluvia en comparación con los datos obtenidos en esta investigación los cuales indican que la turbidez durante la época seca apenas alcanzaba los 5.09 NTU y en cambio durante la época lluviosa hubo un aumento el cual sobrepasaba los 509 NTU, por lo tanto pudimos determinar que los parámetros físicoquímicos son factores que influyen sobre la calidad de la muestra, por ende en la metodología y su grado de sensibilidad. Los autores (Chesnot y Schwartzbrod, 2004; Hachimi et al., 2024) indican que una mayor turbidez, materia particulada, sólidos suspendidos, sustancias orgánicas e inorgánicas, así como grasas y aceites, y otras sustancias inhibitoras presentes en las aguas residuales podrían entonces interferir con la

unión de anticuerpos a los ooquistes de *Cryptosporidium*, lo que lleva a una unión no específica y menores tasas de eficiencia y recuperación.

En la fase experimental de este estudio debido a la alta turbiedad durante la época lluviosa y el aumento de materia orgánica suspendida como limitante durante la toma de las muestras, se logró colectar menos de 50 L de agua cruda y en el procesamiento se tuvieron que realizar lavados adicionales al filtro de la muestra para obtener la mayor recuperación posible, ya que el filtro Envirocheck puede saturarse con más facilidad cuando la turbiedad es alta, dependiendo de la matriz esta puede arrastrar consigo partículas en suspensión como sedimento y materia orgánica. Esta interferencia se debe a las escorrentías causadas por las lluvias, más sin embargo durante la época seca los ríos mantienen menor turbiedad y un volumen bajo de sedimento y materia orgánica en suspensión, lo que hace que la recolección de la muestra sea más eficiente, de manera que esto permite que pueda filtrarse un mayor volumen de agua y que por ende se obtenga una mejor detección de los quistes y ooquistes en las muestras (Manzano y Moreno, 2001). Esto sugiere que en ensayos realizados por Campbell y Smith, (1997), con agua limpia o agua de baja turbidez, cuando la muestra de agua estaba turbia, la eficiencia de recuperación de la técnica IMS disminuyó. Por lo tanto, los resultados sugieren que la técnica IMS se ve afectada en distintos grados por los diferentes componentes materiales presentes en los concentrados de agua y por la interferencia de partículas en suspensión. Según Campbell y Smith, (1997) a pesar de las posibles dificultades que presenta el método IMS con muestras de agua turbia, los resultados de estos viales indican que esta técnica sería una adición muy útil al arsenal de métodos para la concentración de ooquistes de muestras de agua y los participantes del ensayo la consideraron sencilla, fácil de usar y aplicable al procesamiento de múltiples muestras simultáneamente. De manera que es importante destacar que los volúmenes de filtración de agua permitidos por el método para establecer el volumen mínimo de muestra permitido, dado que el método 1623.1-EPA recomienda al menos 10 L de agua superficial no tratada para el análisis, aunque dependiendo de la turbidez de la muestra, se puede necesitar más de un filtro o se pueden utilizar hasta un máximo de 50 L de agua superficial y de 100 hasta 1000 litros de agua tratada. De acuerdo con Pezzana et al., (2000) se ha optimizado la cápsula Envirocheck en muestras grandes de agua potable para la detección de niveles bajos de ooquistes. La elución del filtro por tiempo de contacto y agitación con un vórtice da como resultado una recuperación de ooquistes del 68%. La centrifugación (1250 g; 30 min; 4 °C) mejora la recuperación al 94% sin daño morfológico de los ooquistes. El aumento de la relación de perlas magnéticas con el

volumen de muestra en el procedimiento IMS conduce a una eficiencia del 69%. En estas condiciones, la recuperación general del procedimiento es del 49%, según se evaluó con dosis bajas de ooquistes en muestras de agua del grifo de 100 litros. De manera que la metodología descrita permite la detección de 0,1 ooquistes por litro cuando se procesan muestras de 100 litros, como es el caso de este estudio.

El estudio realizado por De la Cruz et al., (1997) se observó que en los alrededores del Río Caimito se realizan actividades de tipo ganadera, tanto vacuna como porcina, actividad humana y se notó la presencia de una alta cantidad de desechos sólidos que eran vertidos desde el puente ubicado en las cercanías al punto de captación del agua, también se detectó la presencia de tubos que eran parte de un sistema de aguas negras, que para la fecha se encontraba en desuso. Actualmente, veintisiete años después durante nuestro estudio también se pudieron identificar las mismas condiciones, las cuales podrían estar influyendo en la detección de quistes y ooquistes de protozoos como *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en la Planta de Tratamiento Jaime Díaz Quintero de la Chorrera, tales como: la ganadería, un crecimiento urbanístico desmedido, actividades industriales y la proximidad de un manhole que ocasionalmente producto de las lluvias se desborda vertiendo aguas residuales a la fuente de agua que abastece la toma agua que ingresa a la planta de tratamiento proveniente del Río Caimito. El monitoreo de protozoos en las fuentes de agua puede ser específico utilizando información sobre las fuentes de contaminación fecal obtenida de un estudio sanitario, junto con datos históricos sobre precipitaciones, caudal fluvial y turbidez, para ayudar a identificar las condiciones que probablemente provoquen concentraciones máximas de ooquistes (Government of Canada, 2016). Sin embargo, este estudio no arroja datos que determinan una asociación aparente con la contaminación por *Giardia* spp. como también se indica en el estudio realizado por (Ligda et al., 2020)

Durante la investigación realizada por De la Cruz et al., (1997) también se encontró que la planta potabilizadora de Chorrera poseía dificultades con el sistema de sedimentadores y filtradores debido a que la planta abastece a una gran población en donde su caudal de agua es mucho más alto que la capacidad del suministro del sistema de la planta potabilizadora.

La eficiencia del tratamiento es un punto crítico de control en la eliminación de los parásitos, ya que el proceso de tratamiento involucra etapas que operan generalmente en serie, por lo tanto, es importante garantizar la obtención de agua de la mejor calidad

posible, independientemente de las condiciones de la fuente de captación (Alarcón et al., 2005).

En el proceso de coagulación es posible eliminar quistes y ooquistes entre el 90% y el 95% (Gray, 1996). Sin embargo, existen varios factores que se deben controlar en esta etapa, como la dosis adecuada del floculante empleada por volumen de agua de entrada, el tiempo de acción del coagulante y la intensidad de la agitación para garantizar la formación de flóculos que remueven la mayor cantidad de partículas que se encuentran dispersas en el agua (De Zuane, 1997).

Los filtros de cartucho utilizan varios fluidos de elución y métodos de agitación. Debido a las limitaciones de otros filtros como el Genera Filta-Max™, Cryptoscan (Dereck UK) y el filtro Cuno de manera que se consideró la posibilidad de establecer estándares para la detección de *Cryptosporidium* spp. que requerirían el análisis de 1000 litros/día de agua. Sin embargo, en este estudio, no se consideró prudente confiar totalmente en un solo filtro (el Genera Filta-Max™) para todos los estudios futuros. Por lo tanto, se decidió que el filtro Envirochek también debería incluirse como una opción, ya que se recomienda en el nuevo método 1623 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1999).

Tomando en consideración las interferencias detectadas en los análisis atribuibles a parámetros fisicoquímicos importantes para la determinación de la calidad del agua como: cloro, pH, conductividad, turbiedad, STD, salinidad y temperatura, etc. Los parámetros fisicoquímicos mencionados anteriormente podrían ocasionar alguna interferencia sobre los resultados obtenidos durante ambas épocas del año, respecto a la temperatura durante la época lluviosa y seca se obtuvo una temperatura promedio de 26.4 y 27.3 respectivamente, la cual no posee una mayor variación correspondiente a ambas épocas del año. Algunos autores sugieren que los rangos de temperatura para la viabilidad de los ooquistes son muy amplios y va de 20 a 65 °C, sin embargo, otros autores, entre ellos Sherwood et al., (1982) señalan que los ooquistes se mantienen viables por dos semanas a temperaturas desde 5 hasta 20 °C, lo que podría significar que aparentemente tendrían una permanencia menor. Por lo tanto, a bajas temperaturas se reduce en gran medida la viabilidad y el enquistamiento de *Giardia* spp. durante 15 días, y la infectividad se pierde totalmente en dos semanas entre 15°C-20°C y en 5 días a 37°C para *Cryptosporidium* spp. (Cinco et al., 2003). Otros parámetros tales como el pH dieron como resultado un valor promedio de 6,72 en ambas épocas lo que indica que este parámetro se encuentra dentro del rango establecido en el cual los quistes y ooquistes

pueden mantenerse inalterados, ya que un pH menor a 4 o superior a 11 puede disminuir la viabilidad de estos (Dawson et al., 2004). Se ha determinado que el cloro residual libre, a pesar de que el elimina a las bacterias coliformes, su uso resulta insuficiente para matar quistes de parásitos y se necesitarían más de 5 ppm de cloro para eliminar quistes de *Giardia* y más de 80 ppm de cloro para eliminar quistes de *Cryptosporidium*. También es importante recalcar que la efectividad del cloro puede tener una estrecha relación con el resto de los parámetros fisicoquímicos, como por ejemplo la temperatura, esto se debe a que los halógenos son menos efectivos como desinfectantes en agua a bajas temperaturas (Cinco et al., 2003). Debido a la relación de los factores fisicoquímicos mencionados anteriormente con los quistes *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. es importante destacar que *Clostridium perfringens* es una bacteria anaerobia formadora de endosporas, lo que les proporciona resistencia a ciertas condiciones como la irradiación, cloración e incluso a las altas temperaturas, por lo que algunos científicos han sugerido que, si se detecta esta bacteria durante alguno de los procesos de tratamiento, probablemente esto indique que otros microorganismos igualmente resistentes también puedan encontrarse en el agua. La (US EPA, 2006) recomienda monitorear al menos tres o cuatro organismos sustitutos utilizando muestras pareadas de agua superficial y subterránea para calcular la eficiencia de remoción logarítmica, y enumera los siguientes como posibles sustitutos: esporas aeróbicas (p. ej., *Bacillus subtilis*), esporas anaeróbicas (p. ej., *Clostridium perfringens*), coliformes totales, *E. coli*, bacterias enterococos, bacteriófagos, colifagos, diatomeas, turbidez, conteos de partículas y análisis de partículas microscópicas (MPA).

Con relación a los resultados obtenidos de las muestras positivas de agua cruda y sedimentada en la planta potabilizadora Jaime Díaz Quintero, pudimos detectar quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp., provenientes del Río Caimito que abastece de agua cruda a la planta. Por medio de estos resultados se obtiene un indicativo de que el cloro añadido en la etapa de precloración y en las etapas de coagulación, floculación y sedimentación no aseguran la eliminación de los quistes y ooquistes del agua, sin embargo, se pudo determinar la ausencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en todas las muestras de agua potable colectadas, lo que afirma que el proceso de filtración se efectúa de forma eficiente. Por otro lado, las muestras analizadas para *Clostridium perfringens* también resultaron positivas para el agua cruda, sin embargo, resultaron negativas para el agua sedimentada y el agua potable, lo que determina que *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens* no necesariamente se encuentran en el

agua al mismo tiempo, ya que su detección puede deberse a algunos factores que pudimos observar durante el estudio como: los sitios de muestreo y la contaminación fecal de aguas residuales provenientes de las casas o de la actividad agropecuaria en zonas aledañas a la orilla del río caimito, por otra parte una posible asociación entre un indicador y ambos parásitos puede depender de otras variables relacionadas con las condiciones ambientales, el volumen de protozoos o de bacterias en cada una de las matrices de agua o simplemente al azar, por lo tanto uno de los aspectos más relevantes dentro de la investigación es el volumen de agua filtrado, ya que este puede influir significativamente sobre la metodología analítica. Estudios recientes concluyen que las esporas de *C. perfringens* son de 1 a 3 log 10 más abundantes que los ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de agua y no se observó correlación. La especificidad de los sitios de muestreo, la presencia estacional de ooquistes de *Cryptosporidium* en el ambiente y el rendimiento de los diferentes métodos aplicados para detectar ooquistes en aguas podrían explicar las discrepancias entre los estudios. En general, estos datos demuestran que las esporas de *C. perfringens* no son indicadores confiables para predecir la contaminación de aguas crudas por ooquistes de *Cryptosporidium*. Las esporas de *C. perfringens* miden entre 1 y 1,5 μm de diámetro y son capaces de resistir ciertos tratamientos físicos (calor húmedo y seco, desecación, radiación UV y γ) y factores químicos como enzimas, agentes genotóxicos, agentes oxidantes, aldehídos, ácidos y álcalis. Debido a sus características estructurales, se han propuesto como sustitutos de los ooquistes de *Cryptosporidium* para evaluar el rendimiento del tratamiento de agua potable, y más específicamente durante los tratamientos de eliminación. Sin embargo, otros estudios comparativos basados en concentraciones autóctonas de esporas y ooquistes mostraron resultados contradictorios (Agendare et al., 2023).

Mediante la método de detección 1623.1-2012 de la EPA utilizado también se pudo determinar la viabilidad de los de los quistes y ooquistes, debido a su fluorescencia. Para determinar la viabilidad de estas formas quísticas, se deben observar formas ovales con fluorescencia color verde manzana, pared bien definida, con tamaño de 8 a 18 μm de longitud y 5 a 15 μm de ancho que corresponden a *Giardia* spp. y formas esféricas con fluorescencia color verde manzana, con un diámetro aproximado de 4 a 6 μm que corresponden a *Cryptosporidium* spp. (**Figura 8**) (USEPA, 1999).

La presencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. asociados a la presencia de *Clostridium perfringens* en el sistema de tratamiento de agua de la planta potabilizadora Jaime Díaz Quintero ubicada en la Provincia de Panamá Oeste, distrito de La Chorrera según diversos antecedentes bibliográficos ha sido considerada como un indicador de contaminación fecal, por lo tanto ha sido tomado en cuenta para determinar si su posible asociación con este parásito podría reducir la necesidad de realizar análisis microbiológicos frecuentes, sin embargo el estudio realizado por Ligda et al., (2020) no encontró asociación alguna entre bacterias indicadoras fecales y recuentos de (oo)quistes de *Cryptosporidium* o *Giardia*, como se ha informado en estudios previos que han intentado correlacionar *C. perfringens* u otras bacterias indicadoras fecales con recuentos de (oo)quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*.

Estos datos sugieren que ningún organismo indicador bacteriano puede predecir con seguridad la contaminación con estos parásitos, debido en parte a la heterogeneidad de las relaciones entre bacterias indicadoras fecales y el recuento de (oo)quistes, con muchos más recuentos cero en los datos parasitológicos que en los recuentos bacterianos, de manera que *E. coli*, al igual que otras bacterias indicadoras fecales como *Clostridium perfringens*, son insignificantes para predecir la contaminación con *Cryptosporidium* o *Giardia* y su ausencia en el agua potable no indica necesariamente la ausencia de estos parásitos (Ligda et al., 2020).

Entre las desventajas presentadas por (Fradette et al., 2022) bien documentada del Método 1623.1 es la baja recuperación de (oo)quistes. Se ha demostrado que la tasa de recuperación puede ser tan baja como el 50%, lo que lo hace poco confiable. Se documentó que del 8 al 14% de los parásitos se perdieron después del paso de centrifugación de este protocolo en comparación con muestras de la misma composición sometidas solo a IMS y microscopía de fluorescencia. El mismo estudio también encontró una pérdida del 29 al 34% de parásitos atribuible al protocolo de filtración y elución en comparación con muestras idénticas pero sometidas a centrifugación, IMS y microscopía de fluorescencia. Dado que el método de detección para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. sugerido por la EPA presenta un alto costo para las entidades que lo realicen, por lo que la determinación de la asociación de un indicador sería una probable alternativa para los laboratorios de control de calidad de las plantas de tratamiento de agua en Panamá.

En esta investigación, se ha demostrado que la presencia de *Clostridium perfringens* no está asociada significativamente con la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de La Chorrera, lo que representa un

importante avance respecto a la aplicación de la metodología basada en la Norma ISO 14189:2013, el método 1623.1-2012 de la EPA y la búsqueda de nuevas alternativas para el aseguramiento de la calidad del agua para consumo humano en nuestro país.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se obtuvo una mayor recuperación de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. durante la época seca a pesar de que la presencia de ambos es independiente de la época del año.
- *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens* presentaron la misma recuperación en ambas épocas del año.
- Se encontró que no hay una asociación entre *Clostridium perfringens* y *Cryptosporidium* spp., debido a que la presencia de uno no necesariamente indica la presencia del otro.
- Se detectó la presencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua cruda y sedimentada de la planta potabilizadora Jaime Díaz Quintero.
- Se detectó la presencia de *Clostridium perfringens* solamente en muestras de agua cruda del sistema de tratamiento.
- Se demostró la eficiencia del proceso de potabilización del sistema de tratamiento de la Planta Jaime Díaz Quintero de la Chorrera.
- Se detectó la viabilidad de los quistes de *Giardia* spp. y los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. a través del ensayo de inmunofluorescencia del método 1623.1-2012 de la EPA.
- Se determinó que los factores antropogénicos son variables influyentes en la detección de protozoos como *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en las fuentes de captación de agua cruda como el Río Caimito que abastece a la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero de la Chorrera.
- Los parámetros fisicoquímicos resultaron ser factores críticos en el muestreo y el procesamiento de la muestra.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar otros estudios para obtener más datos relacionados al comportamiento de *Clostridium perfringens* y *Cryptosporidium* spp. en otras plantas de tratamiento, bajo las mismas condiciones.
- Evaluar la presencia o ausencia de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. anualmente en los sistemas de tratamiento de agua en la República de Panamá, para verificar la eficiencia del proceso de potabilización.
- En caso de futuras investigaciones, es importante tomar en cuenta algunas limitantes en el método como el uso de artículos de plástico como: goteros, al momento de extraer la muestra de los tubos L10 y los tubos de microcentrífuga, ya que los quistes y ooquistes pueden adherirse a las paredes de este. De manera que se recomienda utilizar cristalería de vidrio curada con solución de elución para evitar la pérdida de muestra.
- Tomar en consideración el volumen recolectado de la muestra sobre todo para agua cruda y sedimentada, debido a que un volumen menor al recomendado por el método influye de manera significativa en los resultados.
- Se recomienda realizar el muestreo directamente con los filtros y no en tanques utilizados en otros procesos, para evitar contaminación cruzada.
- Garantizar la integridad del filtro al momento de tomar la muestra, para evitar que haya rupturas y saturación de sedimento, ya que esto puede afectar la recolección efectiva de la muestra y su proceso de preparación.
- Se recomienda el uso combinado del método EPA 1623.1-2012 con técnicas moleculares como PCR para la obtención de resultados más específicos para una detección más e identificación de los protozoos *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. a más precisa.

BIBLIOGRAFÍA

- ABUSEIR, S. (2023).** A systematic review of frequency and geographic distribution of waterborne parasites in the Middle East and North Africa. In *Eastern Mediterranean Health Journal* (Vol. 29, Issue 2, pp. 151–161). World Health Organization. <https://doi.org/10.26719/emhj.23.016>
- AUGENDRE, L., COSTA, D., ESCOTTE-BINET, S., AUBERT, D., VILLENA, I., DUMÈTRE, A., & LA CARBONA, S. (2023).** Surrogates of foodborne and waterborne protozoan parasites: A review. *Food and Waterborne Parasitology*, 33, e00212. <https://doi.org/10.1016/J.FAWPAR.2023.E00212>
- ALARCÓN, M. A., BELTRÁN, M., CÁRDENAS, M. L., & CAMPOS, M. C. (2005).** *Giardia* en agua Bogotá. *Biomédica*, 25, 353–365.
- ÁLVAREZ, D., PINEDA, V., SANTAMARÍA, A., CALZADA, J., & SALDAÑA, A. (2019).** Diagnóstico e identificación de especies de *Cryptosporidium* en población infantil de áreas rurales en Panamá. *Rev. méd cient.* 2018; 31:32-42.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2001).** Drinking Water Quality and Public Health. *Am. J. of Public Health.* 91: 499-500.
- ARAÚZ, G. (2020).** *Relieve de Panamá.pdf* (p. 22). Universidad Tecnológica Oteima.
- ATIAS, A. (1999).** Parasitología Médica. Mediterráneo, Santiago, Chile.
- BIBLIOTECA NACIONAL DE PANAMÁ. (2021).** - Panamá y sus contrastes naturales. (s/f). Binal.ac.pa. Recuperado el 19 de mayo de 2024, de <https://www.binal.ac.pa/binal/nosotros/82-ofrecemos/94-panama-y-sus-contrastes-naturales.html>
- BRANDI, J., & WILSON-WILDE, L. (2013).** Standard Methods. *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition*, 522–527. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00237-3>
- CAMPBELL, A., & SMITH, H. (1997).** Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from water samples: round robin comparison of techniques. *Water Science and Technology*, 35(11), 397–401. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00292-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00292-8)
- CERMEÑO, J., ARENAS, J., YORI, N., & HERNÁNDEZ, I. (1997).** Universidad, ciencia y tecnología. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 12(46), 39–42. http://homologve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131648212008000100006&lng=es&nr=iso&tlng=es
- CINCO, D., MARTHA, E., MICHEL, L., EVA, E., HARO, M., & RÍOS, G. (2003).** INCIDENCIA Y VIABILIDAD DE *Cryptosporidium parvum* EN EL AGUA.
- CHESNOT, T., & SCHWARTZBROD, J. (2004).** Quantitative and qualitative comparison of density-based purification methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in turbid environmental matrices. *Journal of Microbiological Methods*, 58(3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2004.05.001>

CHO, J. C.; CHO, H. B., & KIM, S. J. (2000). Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. *Environmental Pollution* 109: 137-146.

CDC. (2017). Giardiasis. *Centers for Disease Control and Prevention*.

CDC. (2019). Cryptosporidiosis. *Centers for Disease Control and Prevention*.

DAWSON D.J., SAMUEL C.M., SCRANNAGE V., & ATHERTON C.J. (2004). Survival of *Cryptosporidium* species in environments relevant to foods and beverages. *Journal of Applied Microbiology* 96:1222-1229. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02281.x. PMID: 15139913.

DESILVA, M. B., SCHAFER, S., KENDALL SCOTT, M., ROBINSON, B., HILLS, A., BUSER, G. L., SALIS, K., GARGANO, J., YODER, J., HILL, V., XIAO, L., ROELLIG, D., & HEDBERG, K. (2016). Communitywide cryptosporidiosis outbreak associated with a surface water-supplied municipal water system - Baker City, Oregon, 2013. *Epidemiology and Infection*, 144(2), 274–284. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001831>

DE LA CRUZ, A.; RODRÍGUEZ, Y., & CÓRDOBA, D. (1997). Detección de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp., colifagos y coliformes como indicadores de contaminación en agua cruda, tratada y red de distribución en algunas regiones de la República de Panamá. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Escuela de Biología. Universidad de Panamá.

DE ZUANE, J. (1997). Handbook of Drinking Water Quality. John Wiley & Sons, Inc., 2(1). http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484_SISTEM_PEMBEU_NGAN_TERPUSAT_STRATEGI_MELESTARI.

DE LA PARTE-PÉREZ, M.A. A., BRUZUAL, E., BRITO, A., & HURTADO, M. DEL P. (2005). *Cryptosporidium* spp. y Criptosporidiosis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 06-14. Recuperado en 22 de julio de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562005000100003&lng=es&tlng=es.

DOMÉNECH, J. (2003). *Cryptosporidium* y *Giardia*, problemas emergentes en el agua de consumo humano. ELSERVIER, Vol. 22. Núm. 11. páginas 112-116.

EFSTRATIOU, A., ONGERTH, J., & KARANIS, P. (2017). Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Research*, 123, 96–112. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.06.042>

- FENG, C., XU, Z., LI, Y., ZHU, N., & WANG, Z. (2021).** Research progress on the contamination status and control policy of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water. In *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development* (Vol. 11, Issue 6, pp. 867–886). IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/washdev.2021.151>
- FENG, Y., RYAN, U. M., & XIAO, L. (2018).** Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 34(11), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2018.07.009>
- FRANCY, D., HELSEL, D., & NALLY, R. (2000).** Occurrence and Distribution of Microbiological Indicators in Groundwater and Stream Water. *Water Environ. Res.* 72:152-161.
- FRADETTE, M. S., BOURQUE, S. L., RODRIGUEZ, M. J., & CHARETTE, S. J. (2024).** Year-round monitoring of three water sources in Québec, Canada, reveals site-specific differences in conditions for *Cryptosporidium* and *Giardia* contamination. *Canadian Journal of Microbiology*, 70(7), 262–274. <https://doi.org/10.1139/cjm-2023-0207>
- FRADETTE, M. S., CULLEY, A. I., & CHARETTE, S. J. (2022).** Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Environmental Water Samples: A Journey into the Past and New Perspectives. *Microorganisms*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061175>
- GESCHE, E., VALLEJOS, A., & SAEZ, M. (2003).** Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). *Archivos de medicina veterinaria*, 35(1), 99-107. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100011>
- GOVERNMENT OF CANADA. (2016).** Enteric Protozoa in Drinking Water: *Giardia* and *Cryptosporidium*. Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. <https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/enteric-protozoa-drinking-water/consultation-document.html#a514>
- GLYNN, J., & G. HEINKE. (1999).** Ingeniería Ambiental. 2ª ed., Prentice Hall Hispanoamericana S.A., México.
- GRAY, N. (1996).** Calidad del Agua Potable, Problemas y Soluciones. Acribia S.A., Zaragoza. España.
- HACHIMI, O., FALENDER, R., DAVIS, G., WAFULA, R. V., SUTTON, M., BANCROFT, J., CIESLAK, P., KELLY, C., KAYA, D., & RADNIECKI, T. (2024).** Evaluation of molecular-based methods for the detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. in wastewater. *Science of the Total Environment*, 947. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174219>
- HIJNEN, W. A. M., WILLEMSSEN-ZWAAGSTRA, J., HIEMSTRA, P., MEDEMA, G. J., & VAN DER KOOIJ, D. (2000).** Removal of sulphite-reducing clostridia spores by full-scale water treatment processes as a surrogate for protozoan oocysts removal. *Water Science and Technology* 41: 165- 171

- ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. (1981).** Microorganismos de los Alimentos. 1 Métodos Recomendados. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2022).** Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos y Plaguicidas (ERIA). Evaluación De Riesgos: *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua para consumo humano en Colombia. Bogotá, D.C.
- ISO 14189:2013. (2013).** INTERNATIONAL STANDARD Water quality — Enumeration of *Clostridium perfringens* — Method Standards. INTERNATIONAL STANDARD ISO 14189, First edit, 4. <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/54495/4ac8cca7b59b480093002cb67758b989/ISO-14189-2013.pdf>
- JAY, J. (1992).** Microbiología Moderna de los Alimentos. 3ª ed., Acribia S.A., Zaragoza, España.
- LANAO MALDONADO, M. (2012).** Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Universidad de Zaragoza.
- LIGDA, P., CLAEREBOUT, E., KOSTOPOULOU, D., ZDRAGAS, A., CASAERT, S., ROBERTSON, L. J., & SOTIRAKI, S. (2020).** *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water and drinking water: Animal sources and towards the use of a machine-learning approach as a tool for predicting contamination. Environmental Pollution, 264, 114766. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114766>
- LÓPEZ, M. L. R., SÁNCHEZ, M. S., BAENA, C. M. A., GONZÁLEZ, L. M. A., & URHÁN, J. B. (2016).** Verificación del método para la detección y cuantificación de *Clostridium perfringens* en agua potable mediante filtración por membrana. Revista Politécnica, 12(23), 83-89.
- LÓPEZ, Z., GARCÍA, E., & LORENA, A. (2022).** *Máster Universitario en Ingeniería y Gestión Ambiental*.
- LU, Y., ZHANG, X., GUAN, Z., JI, R., PENG, F., ZHAO, C., GAO, W., & GAO, F. (2025).** Pathogénèse moléculaire de *Cryptosporidium* et progrès dans les interventions thérapeutiques. In *Parasite (Paris, France)* (Vol. 32, p. 7). <https://doi.org/10.1051/parasite/2025001>
- MAC FADDIN, J. (1980).** Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- MANZANO, B., & MORENO, L. A. (2001).** Determinación y cuantificación de *Cryptosporidium* spp y *Giardia* spp como indicadores de contaminación parasitaria en sistemas de lagunaje. 1–212.
- MERCK, S.A. (2000).** Microbiology Manual. Deutscher Akreditierungs Rat, Berlin, Alemania.

- MICI. (2019).** Resolución N° 35 de 6 de mayo de 2019. 148(28437), 6–20.
https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/28090_A/GacetaNo_28090a_20160805.pdf
- MORENO, M., ÁLVAREZ, H., CHACÓN, A., & BIANCHERI, I. (2021).** Simulación hidrológica de los impactos del cambio climático en la cuenca del río Caimito, La Chorrera, Panamá Oeste. *I+D Tecnológico*, 17(2).
<https://doi.org/10.33412/idt.v17.2.3147>
- MOUSSA, A. S., ASHOUR, A. A., SOLIMAN, M. I., TAHA, H. A., AL-HERRAWY, A. Z., & GAD, M. (2023).** Fate of *Cryptosporidium* and *Giardia* through conventional and compact drinking water treatment plants. *Parasitology research*, 122(11), 2491–2501.
<https://doi.org/10.1007/s00436-023-07947-8>
- GRAY, N.F. (1996).** CALIDAD DEL AGUA POTABLE: PROBLEMAS Y SOLUCIONES. *ACRIBIA*, 365.
- OLIVARES, J. (2021).** Modelado de un decantador secundario circular en Solid Edge. *Universidad de Sevilla*. https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/127304/TFG-3676-LUCAS_OLIVARES.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (1995).** Guías para la Calidad del Agua Potable: Recomendaciones, Volumen 1. Ginebra (Informe Técnico sin número).
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2011).** Guías para la calidad del agua de consumo humano. Cuarta edición que incorpora la primera adenda.
- ONGERTH, J. E., PLUTZER, J., & KARANIS, P. (2018).** *Cryptosporidium and Giardia—Levels and Distribution in Surface Water throughout Europe*. 690.
<https://doi.org/10.3390/proceedings2110690>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. (2022).** Capítulo 3.10.2. Código Sanitario Para Los Animales Terrestres, VOLUMEN II, 1–20.
<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=preface.htm>
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2004).** Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida Manual II: Diseño de plantas de tecnología apropiada. *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Del Ambiente*, 319.
http://www.ingenieriasanitaria.com.pe/pdf/manual1/tomo1/ma1_tomo1_indice.pdf
- ÓRGANO DEL ESTADO, (1997).** “Por el cual se dicta el marco regulatorio e institucional para la prestación de los servicios de agua potable y alcantarillado sanitario”. *Gaceta Oficial DECRETO LEY No. 2 (De 7 de enero de 1997) Artículo 9, página 6*.
https://www.asep.gob.pa/wpcontent/uploads/COVER_2018/Comision_Sustanciadora/D_L2_agua.pdf
- PAYMENT, P. (1991).** Fate of Human Enteric Viruses, Coliphages and *Clostridium perfringens* during drinking-Water Treatment. *Can. J. Microbiol.* 37: 154-157.

- PAYMENT, P., & E. FRANCO. (1993).** *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 9: 2418-2424.
- PÉREZ, B. S. (2010).** *Cryptosporidium* y *Toxoplasma*. Dos importantes protozoos parásitos transmisibles por los alimentos y el agua. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- PEZZANA, A., VILAGINÈS, P., BORDET, F., COQUARD, D., SARRETTE, B., & VILAGINÈS, R. (2000).** Optimization of the Envirochek capsule method and immunomagnetic separation procedure for the detection of low levels of *Cryptosporidium* in large drinking water samples. *Water Science and Technology*, 41(7), 111–117. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0122>
- PIGNATA, C., BONETTA, S., BONETTA, S., CACCIÒ, S. M., SANNELLA, A. R., GILLI, G., & CARRARO, E. (2019).** *Cryptosporidium* oocyst contamination in drinking water: A case study in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph16112055>
- RADMAN, N. E. (2023).** Parasitología comparada. Modelos parasitarios. Parte I. Protozoos. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/148720>
- RÉGIMEN PLUVIÓMETRICO DE PANAMÁ (2010)** - *Instituto de Meteorología e Hidrología de Panamá*. (s/f). Gob.pa. Recuperado el 19 de mayo de 2024, de <https://www.imhpa.gob.pa/es/regimen-pluviometrico-panama>
- RIBAS, F., BERNAL, A., & PERRAMÓN, J. (2000).** Elimination of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, turbidity and particles in a drinking water treatment plant with clarification and double filtration. *Water Science and Technology*. 41: 203-211.
- RIVERA, B.; BARAHONA O., & GUERRERO J. (1991).** Identificación de ooquistes del género *Cryptosporidium* y quistes del género *Giardia* en aguas crudas, tratadas y redes de distribución en algunas regiones de la República de Panamá. Estudio de Graduación. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología. Escuela de Biología, Universidad de Panamá.
- RODRIGUEZ, J. C., & ROYO, G. (2008).** *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. Control y calidad SEIMC.
- RODRÍGUEZ MIRANDA, J. P. (2024).** Potabilización del agua: Teoría aplicada (1.a ed.). Alpha Editorial S. A.
- SHERWOOD, D., ANGUS, K. W., SNODGRASS, D. R., & TZIPORI, S. (1982).** Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infection and Immunity*, 38(2), 471–475. <https://doi.org/10.1128/iai.38.2.471-475.1982>
- SNEATH, P., MAIR, N., SHARPE, M. E., & HOLT, J. (1986).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2, Williams-Wilkins, Baltimore, USA.

- THATCHER, F., & CLARK, D. (1973).** Análisis Microbiológico de los Alimentos. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- TSUJI, O. V., & RIVERA, T. C. (2009).** Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Facultad Mexicana de Medicina, Universidad La Salle, Servicio de Parasitología y Micología, Instituto Nacional de Pediatría. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 8(31), 75-90.
- USEPA. (1999).** Method 1622: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency, Enero. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/epa-1622.pdf>
- USEPA. (2012).** Method 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA. United States Protect Agency, 83. <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/epa816r12001.pdf>
- WANG, X., WANG, X., & CAO, J. (2023).** Environmental Factors Associated with Cryptosporidium and Giardia. In *Pathogens* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030420>
- XIAO, S., ZHANG, Y., ZHAO, X., SUN, L., & HU, S. (2018).** Presence and molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia in recreational lake water in Tianjin, China: A preliminary study. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20902-3>
- YE, X., LI, C., LI, X., ZHANG, Y., YANG, P., WEN, L., & YANG, G. (2017).** Optimize the EPA 1623 method to detect Cryptosporidium and Giardia in drinking water. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 5, 1838-1841.

ANEXOS

Anexo 1. Hojas de custodia de muestreo de campo

Tabla 4. Hoja De Custodia De Muestreo De Campo
Fecha: 17 de agosto de 2021

Trazabilidad de la muestra				Características IN SITU								Condiciones del muestreo						
Nº de muestra	Sistema de abastecimiento	Elemento	Punto de muestreo	Hora	Cloro residual (mg/L)	Turbiedad (NTU)	pH (Unidad. pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (µohms/cm-1)	STD (mg/L)	Salinidad (‰)	Condición climática	Características	Tipo de muestra	Envase	Volumen (mL)	Partículas detectables	Preservantes
1	PPJDQ	Agua	Grifo de agua tratada	8:05 am	0.65	0.88	7.02	26.2	83.8	40.6	0.04	Nublado	FQ/BB/BP	Simple	P	100 L	No	Tiosulfato de sodio
2	PPJDQ	Agua	Grifo de agua sedimentada	9:55 am	0.02	7.32	5.60	24.5	143.8	68.1	0.07	Nublado	FQ/BB/BP	Simple	P	20 L	No	Tiosulfato de sodio
3	PPJDQ	Agua	Grifo de agua cruda	8:45 am	-	486.0	7.00	25.3	50.6	24.0	0.07	Nublado	FQ/BB/BP	Simple	P	2 L	No	Tiosulfato de sodio

Tabla 5. Hoja De Custodia De Muestreo De Campo
Fecha: 21 de septiembre de 2021

Trazabilidad de la muestra				Características IN SITU								Condiciones del muestreo						
Nº de muestra	Sistema de abastecimiento	Elemento	Punto de muestreo	Hora	Cloro residual (mg/L)	Turbiedad (NTU)	pH (Unidad. pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (µohms/cm-1)	STD (mg/L)	Salinidad (‰)	Condición climática	Características	Tipo de muestra	Envase	Volumen (mL)	Partículas detectables	Preservantes
1	PPJDQ	Agua	Grifo de agua tratada	9:14 am	0.80	0.29	6.91	27.1	102.7	48.5	0.05	Nublado	FQ/BB/BP	Simple	P	100 L	No	Tiosulfato de sodio
2	PPJDQ	Agua	Grifo de agua sedimentada	11:00 am	0.37	2.29	6.43	26.7	112.3	53.6	0.05	Nublado	FQ/BB/BP	Simple	P	50 L	No	Tiosulfato de sodio
3	PPJDQ	Agua	Grifo de agua cruda	9:35 am	-	509.0	7.12	27.2	73.4	58.8	0.08	Nublado	FQ/BB/BP	Simple	P	1 L	Si	Tiosulfato de sodio

Tabla 6. Hoja De Custodia De Muestreo De Campo
Fecha: 26 de octubre de 2021

Trazabilidad de la muestra				Características IN SITU								Condiciones del muestreo						
Nº de muestra	Sistema de abastecimiento	Elemento	Punto de muestreo	Hora	Cloro residual (mg/L)	Turbiedad (NTU)	pH (Unidad. pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (µohms/cm-1)	STD (mg/L)	Salinidad (‰)	Condición climática	Características	Tipo de muestra	Envase	Volumen (mL)	Partículas detectables	Preservantes
1	PPJDQ	Agua	Grifo de agua tratada	8:17 am	0.78	0.57	6.78	26.4	190.4	90.1	0.09	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	100 L	No	Tiosulfato de sodio
2	PPJDQ	Agua	Grifo de agua sedimentada	9:29 am	0.28	4.00	6.66	27.0	106.0	51.7	0.05	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	30 L	No	Tiosulfato de sodio
3	PPJDQ	Agua	Grifo de agua cruda	8:35 am	-	33.3	7.00	27.1	226.0	122.4	0.12	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	10 L	No	Tiosulfato de sodio

Tabla 7. Hoja De Custodia De Muestreo De Campo
Fecha: 25 de enero de 2022

Trazabilidad de la muestra				Características IN SITU								Condiciones del muestreo						
Nº de muestra	Sistema de abastecimiento	Elemento	Punto de muestreo	Hora	Cloro residual (mg/L)	Turbiedad (NTU)	pH (Unidad. pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (µohms/cm-1)	STD (mg/L)	Salinidad (‰)	Condición climática	Características	Tipo de muestra	Envase	Volumen (mL)	Partículas detectables	Preservantes
1	PPJDQ	Agua	Grifo de agua tratada	9:26 am	1.24	0.38	6.52	26.4	239.0	75.3	0.11	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	100 L	No	Tiosulfato de sodio
2	PPJDQ	Agua	Grifo de agua sedimentada	9:37 am	0.46	1.04	6.82	27.2	166.9	95.0	0.09	Soleado	FQ/B/B/BP	Simple	P	50 L	No	Tiosulfato de sodio
3	PPJDQ	Agua	Grifo de agua cruda	10:30 am	-	4.91	6.91	26.9	135.3	81.5	0.08	Soleado	FQ/B/B/BP	Simple	P	50 L	No	Tiosulfato de sodio

Tabla 8. Hoja De Custodia De Muestreo De Campo

Fecha: 22 de marzo de 2022

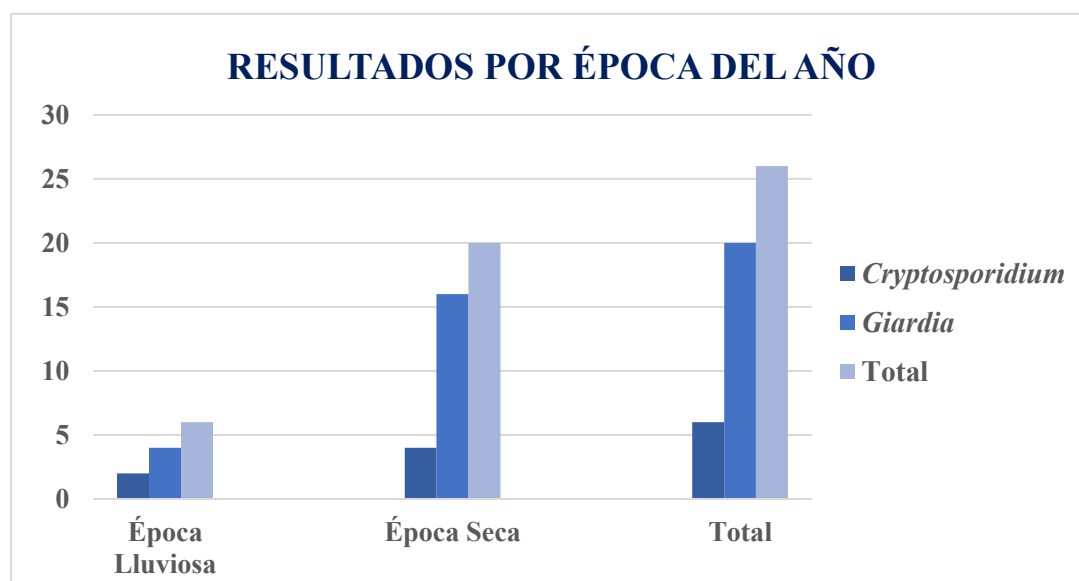
Trazabilidad de la muestra				Características IN SITU									Condiciones del muestreo					
Nº de muestra	Sistema de abastecimiento	Elemento	Punto de muestreo	Hora	Cloro residual (mg/L)	Turbiedad (NTU)	pH (Unidad. pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (µohms/cm-1)	STD (mg/L)	Salinidad (‰)	Condición climática	Características	Tipo de muestra	Envase	Volumen (mL)	Partículas detectables	Preservantes
1	PPJDQ	Agua	Grifo de agua tratada	8:53 am	0.80	0.27	6.42	29.1	165.9	78.8	0.08	Soleado	FQ/BB/BP	Simple	P	100 L	No	Tiosulfato de sodio
2	PPJDQ	Agua	Grifo de agua sedimentada	9:20 am	0.42	1.01	6.72	28.1	154.3	73.1	0.07	Soleado	FQ/BB/BP	Simple	P	50 L	No	Tiosulfato de sodio
3	PPJDQ	Agua	Grifo de agua cruda	9:05 am	-	3.07	6.72	26.5	162.0	76.8	0.08	Soleado	FQ/BB/BP	Simple	P	50 L	No	Tiosulfato de sodio

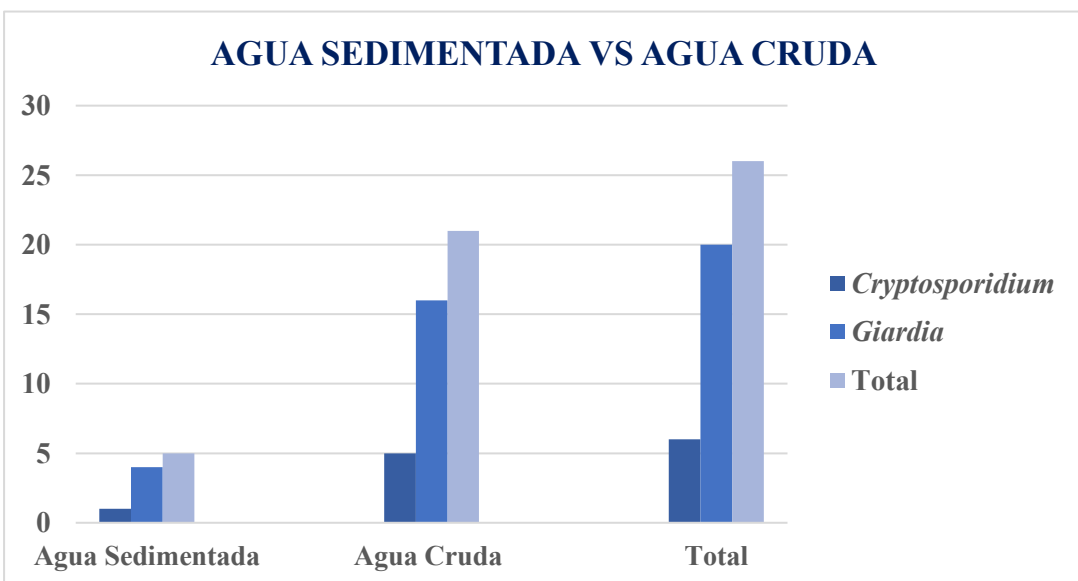
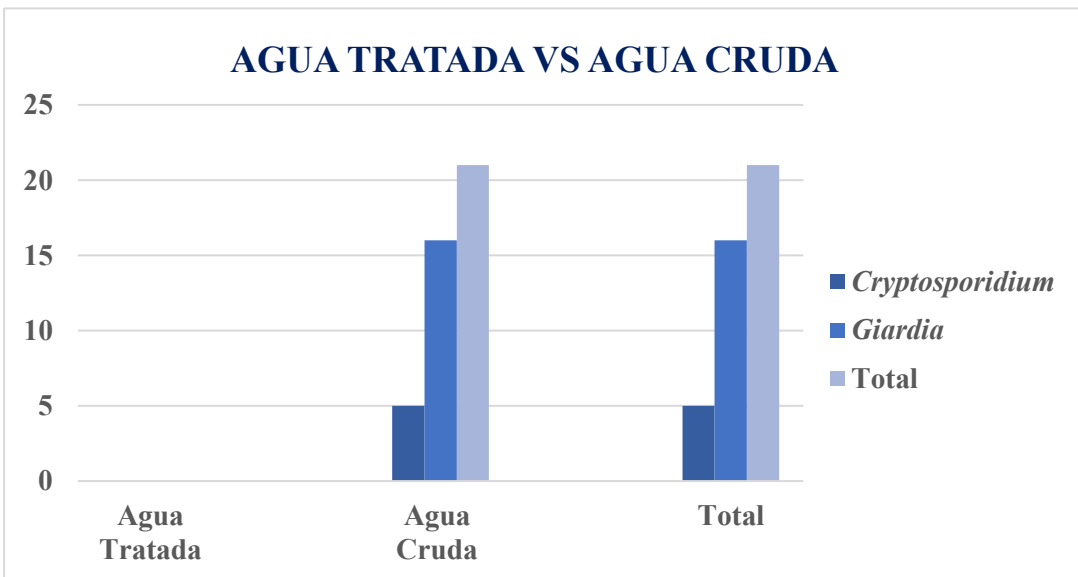
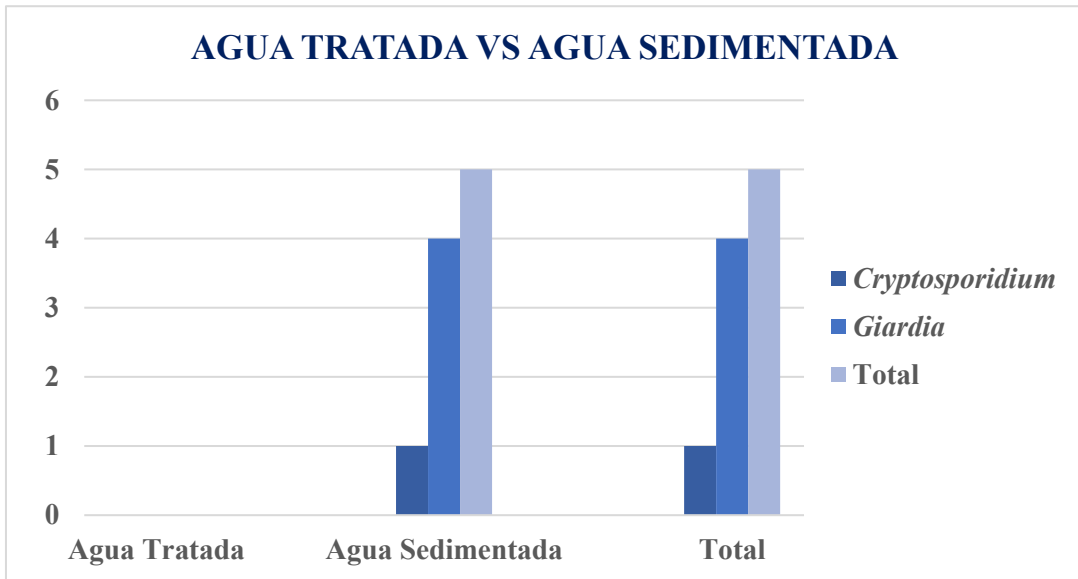
Tabla 9. Hoja De Custodia De Muestreo De Campo

Fecha: 19 de abril de 2022

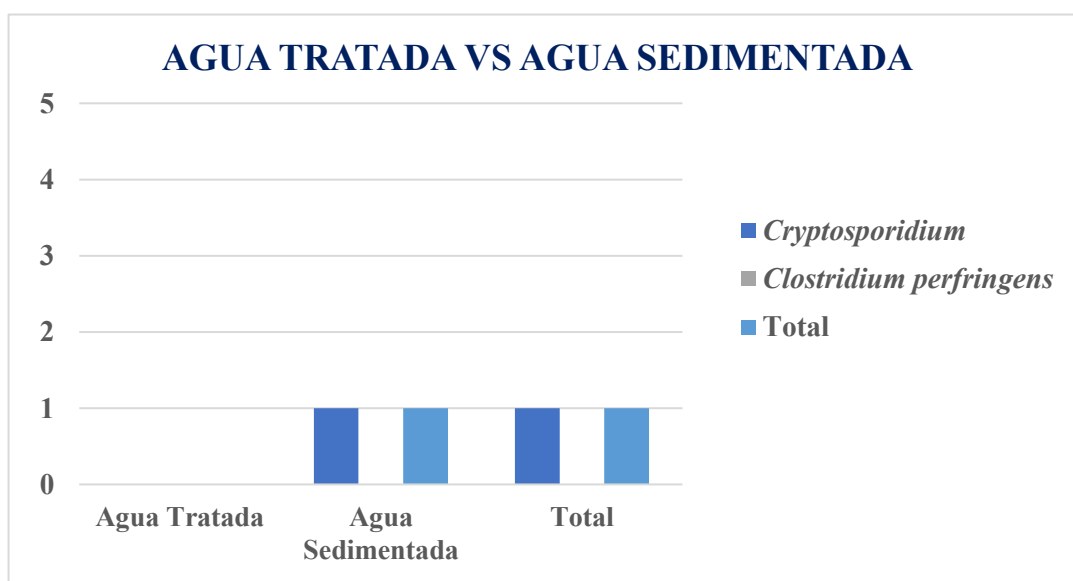
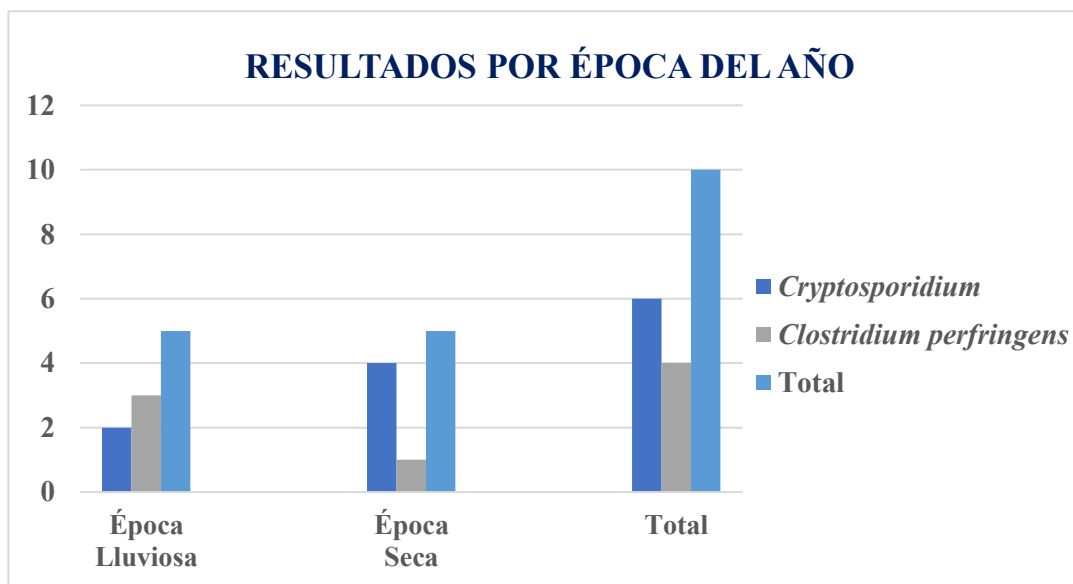
Trazabilidad de la muestra				Características IN SITU									Condiciones del muestreo					
Nº de muestra	Sistema de abastecimiento	Elemento	Punto de muestreo	Hora	Cloro residual (mg/L)	Turbiedad (NTU)	pH (Unidad. pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (µohms/cm-1)	STD (mg/L)	Salinidad (‰)	Condición climática	Características	Tipo de muestra	Envase	Volumen (mL)	Partículas detectables	Preservantes
1	PPJDQ	Agua	Grifo de agua tratada	10:19 am	1.75	0.55	6.70	27.4	242.0	110.7	0.11	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	100 L	No	Tiosulfato de sodio
2	PPJDQ	Agua	Grifo de agua sedimentada	10:06am	0.58	2.49	6.85	27.5	162.6	77.1	0.08	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	50 L	No	Tiosulfato de sodio
3	PPJDQ	Agua	Grifo de agua cruda	7:35 am	-	5.03	6.84	28.7	228.0	106.8	0.11	Nublado	FQ/B/B/BP	Simple	P	30 L	No	Tiosulfato de sodio

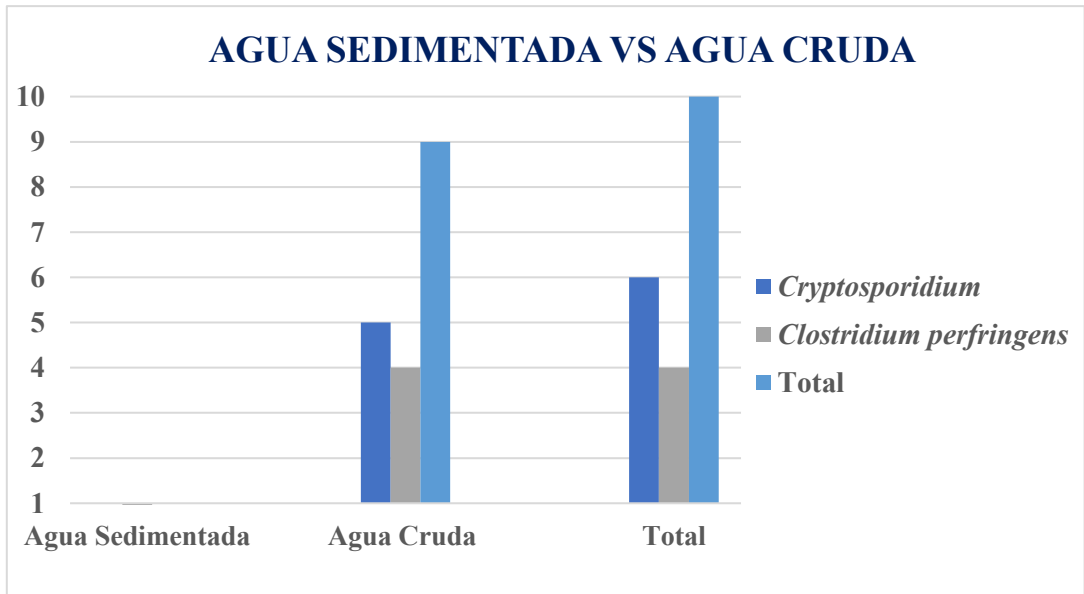
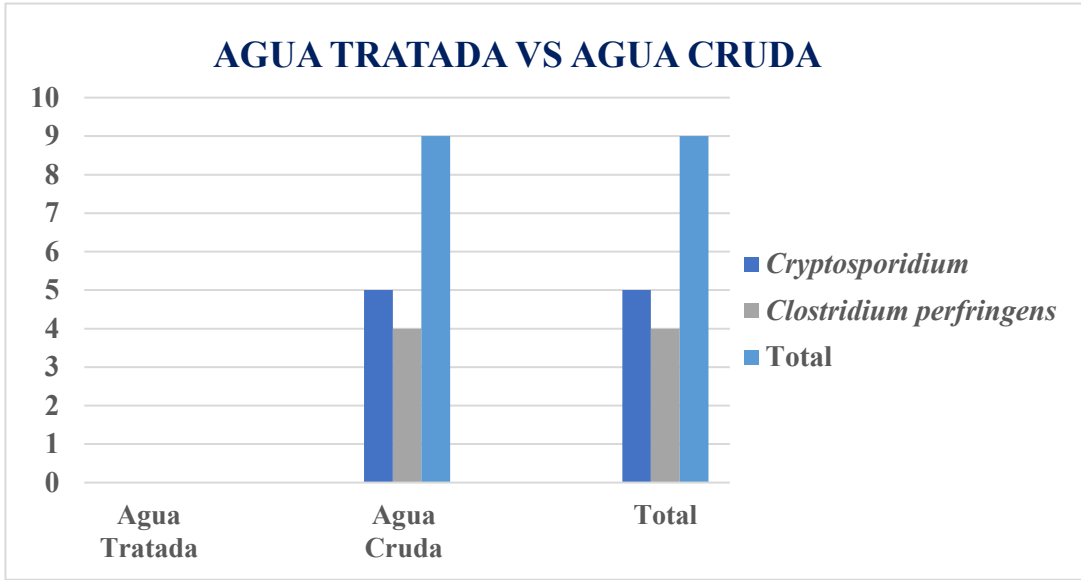
Anexo 2. Gráficas por época y fase de tratamiento para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp.





Anexo 3. Gráficas por época y fase de tratamiento para *Cryptosporidium* spp. y *Clostridium perfringens*





Anexo 4. Proceso de Tratamiento de agua, Sistema de filtración y puntos de muestreo.



Figura 4. Sistema de tratamiento de la Planta Potabilizadora Jaime Díaz Quintero.



Figura 5. Sistema de filtración Envirocheck.



Figura 6. Puntos de muestreo 1. Grifo de agua tratada, 2. Grifo de agua sedimentada, 3. Grifo de agua cruda.

Anexo 5. Detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. por microscopía de inmunofluorescencia

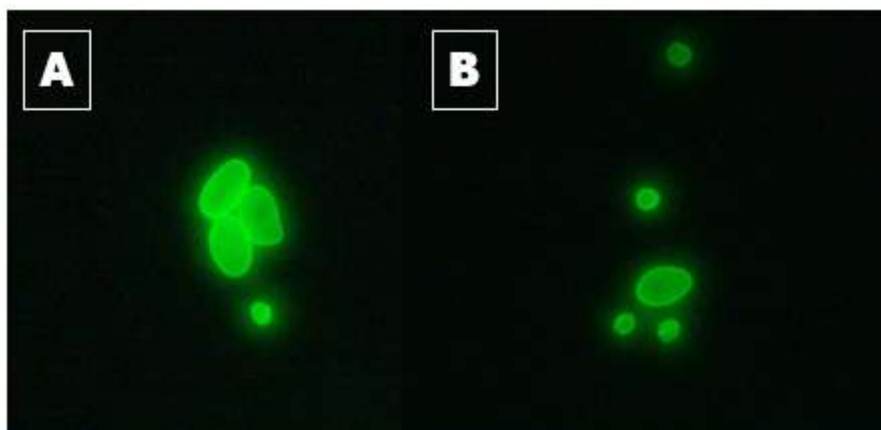


Figura 7. Imágenes microscópicas de *Giardia* spp. (A) y *Cryptosporidium* spp. (B) teñidos con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AquaGlo™ G/C combo).

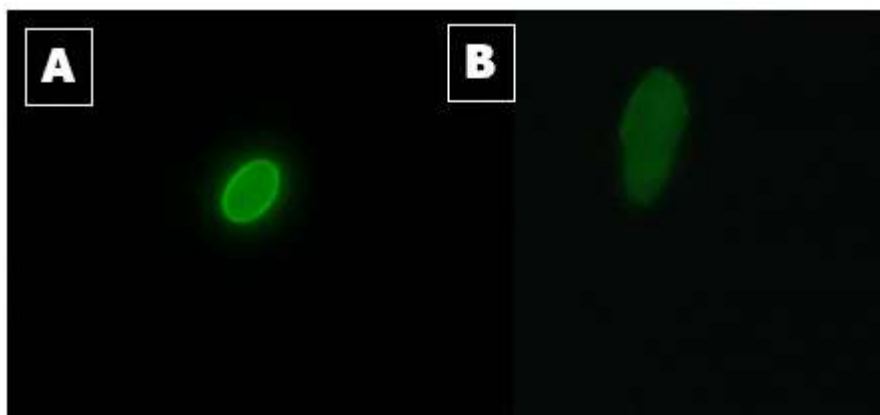


Figura 8. Imágenes microscópicas de *Giardia* spp. (A) y un artefacto (B), teñidos con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AquaGlo™ G/C combo).

Anexo 6. Metodología de análisis

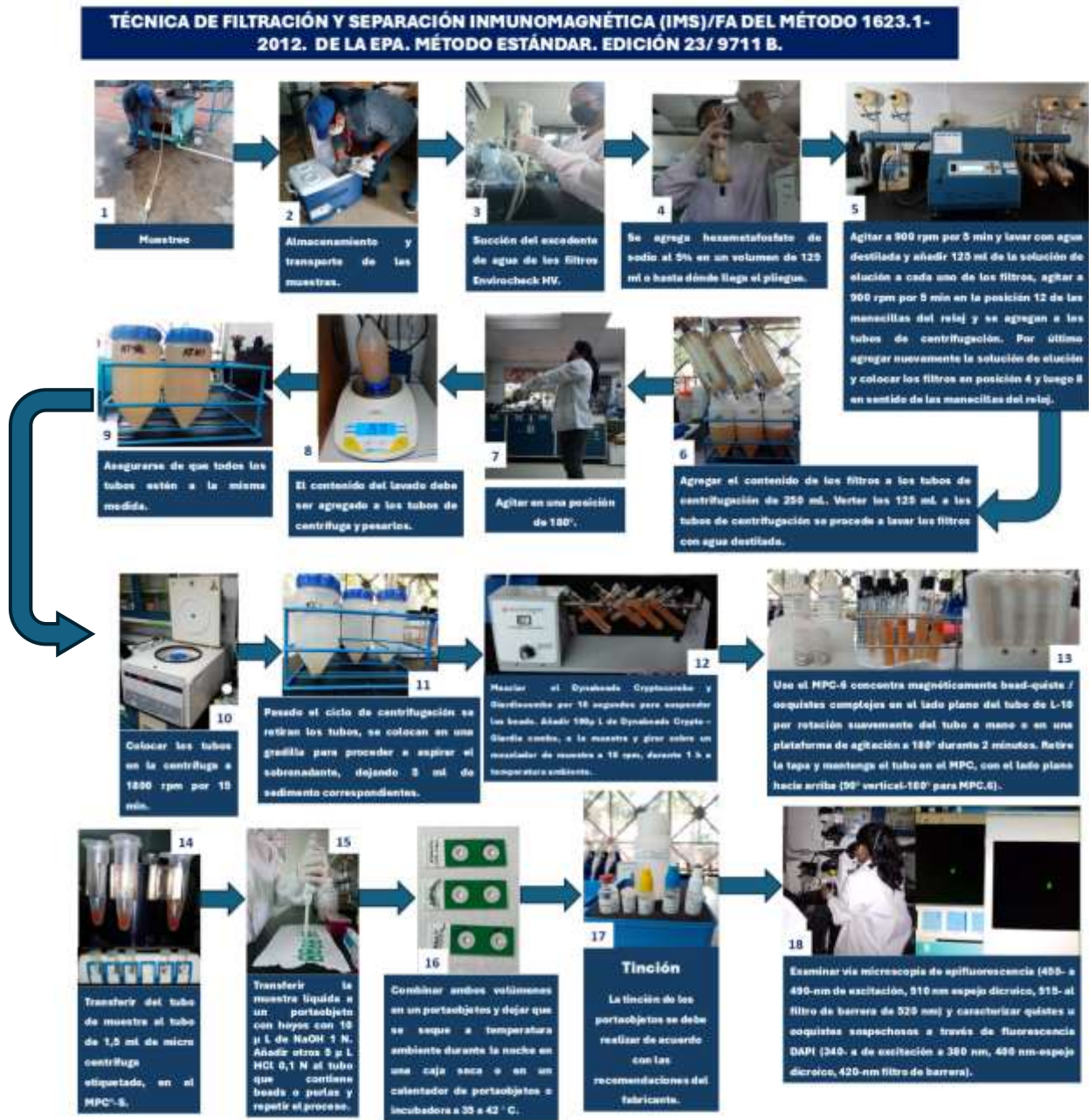


Figura 9. Determinación de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en agua por la técnica de filtración y separación inmunomagnética (IMS)/FA del método 1623.1-2012. De la EPA. MÉTODO ESTÁNDAR. EDICIÓN 23/ 9711 B.

Método ISO 14189:2013

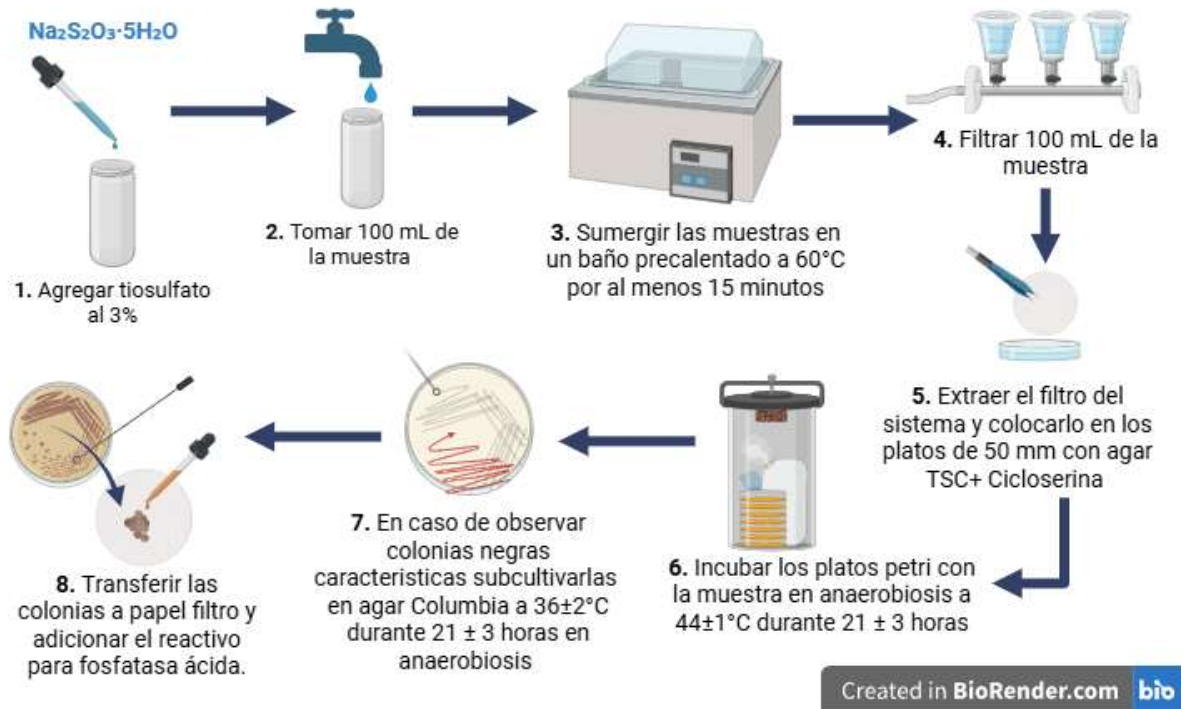


Figura 10. Enumeración de *Clostridium perfringens* — Método mediante filtración por membrana ISO 14189:2013.