



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTA Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**TESIS DE LICENCIATURA**



**“DETECCIÓN DE PROTOZOOS Y OTROS ENDOPARÁSITOS EN  
MUESTRAS DE AGUA Y AIRE DE LA BAHÍA DE PANAMÁ DURANTE LA  
ESTACIÓN SECA DEL 2021”**

**PRESENTADO POR:**

GARCÍA GUADALUPE 8-937-977

DOMÍNGUEZ BETZAIDA 8-935-2113

**DIRECTORA DE TESIS:**

Mgter. NIVIA RÍOS

**Trabajo de graduación para optar  
por el título de licenciatura en  
Biología, con orientación en  
Microbiología y Parasitología.**

**Panamá, República de Panamá  
2023.**

# **I. DEDICATORIA**

Primeramente, a Dios por permitirnos llegar a dónde estamos y a nuestros padres por todo su apoyo, motivación, palabras de alientos en los momentos más difíciles de la carrera y los sacrificios realizados para que pudiéramos culminar nuestros estudios con éxito.

## **II. AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, a Dios por permitirnos llegar a donde estamos.

A nuestros asesores: Mgter. Nivia Ríos, Mgter. Fermín Mejía y Dr. Alex O. Martínez. Por sus apoyos, sugerencias, correcciones, consejos, dedicación y tiempo brindados para desarrollar la presente investigación; que con gran paciencia y toda la disposición nos compartieron sus conocimientos, enseñanzas y experiencias permitiéndonos crecer y desarrollarnos académicamente.

Al ministerio de Ambiente por la financiación del proyecto mediante el convenio N° 0-26-45-2019 de detección molecular y análisis filogenético de virus, bacteriófagos, bacterias, hongos filamentosos y parásitos patógenos en aire y agua provenientes de la bahía de Panamá del fondo de agua, áreas protegidas y vida silvestre.

Al Laboratorio de Microbiología de aguas (LAMA) y Laboratorio de Microbiología experimental y aplicada (LAMEXA), de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá, por acogernos y el apoyo brindado durante la realización de nuestra investigación.

A todos nuestros profesores que a lo largo de nuestra carrera universitaria compartieron con nosotras enseñanzas valiosas en las aulas de clases y forman parte importante de los logros alcanzados hasta el momento.

A nuestros padres, familiares y amigos, por su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo, confianza y perseverancia en saber que podíamos lograrlo a pesar de todo y de cualquier inconveniente durante nuestro avance en esta investigación.

### **III. ÍNDICE GENERAL**

## ÍNDICE GENERAL

I. DEDICATORIA .....	2
II. AGRADECIMIENTO .....	4
III. ÍNDICE GENERAL .....	6
IV. RESUMEN .....	13
CAPÍTULO I .....	16
INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO.....	16
MARCO TEÓRICO.....	23
1. GENERALIDADES DEL REINO PROTOZOO .....	23
1.1 Morfología .....	24
1.2 Movilidad.....	26
1.3 Metabolismo.....	26
2 PROTOZOOS DE INTERÉS.....	27
2.1 <i>Giardia</i> spp.....	27
2.1.1 Generalidades y Morfología .....	27
2.1.2 Ciclo Biológico.....	28
2.1.3 Sintomatología clínica.....	29
2.1.4 Diagnóstico .....	30
2.1.5 Tratamiento .....	30
2.2 <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	30
2.2.1 Generalidades y Morfología .....	30
2.2.2 Ciclo Biológico.....	31
2.2.3 Sintomatología clínica.....	32
2.2.4 Diagnósticos .....	32
2.2.5 Tratamiento .....	33
2.2.6 Generalidades y Morfología .....	34
2.2.7 Ciclo Biológico.....	35
2.2.8 Sintomatología clínica.....	36
2.2.9 Diagnóstico .....	36
2.3.5 Tratamiento.....	37

<b>3</b>	<b>MÉTODOS DE OBSERVACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO Y DIFERENCIACIÓN DE <i>GIARDIA</i> SPP., <i>CYCLOSPORA</i> SPP. Y <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>DE LOS CICLOS DE VIDA Y LAS VARIACIONES EN EL CLIMA</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>RESISTENCIA A LA INMUNIDAD DEL HOSPEDERO</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>ESTUDIOS PREVIOS REALIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE PROTOZOOS EN AGUAS COSTERAS</b>	<b>43</b>
	Objetivo general	45
	Objetivo específico	45
	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>46</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>46</b>
<b>1.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>47</b>
<b>1.1</b>	<b>Área de estudio</b>	<b>47</b>
<b>1.2</b>	<b>Sitios de muestreo</b>	<b>47</b>
<b>1.3</b>	<b>Método en campo</b>	<b>49</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Colecta de las muestras de aire</b>	<b>49</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Colecta de las Muestras de agua</b>	<b>49</b>
<b>1.4</b>	<b>Método de laboratorio</b>	<b>49</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Procesamiento de las muestras de aire</b>	<b>49</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Procesamiento de las muestras de agua</b>	<b>50</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Técnicas de Concentración</b>	<b>51</b>
<b>1.4.4</b>	<b>Protocolo de Tinción</b>	<b>51</b>
	<b>CAPÍTULO III</b>	<b>53</b>
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
	<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>63</b>
	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>63</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>73</b>

## Índice de Cuadros

<b>Tabla 1.</b> Características morfológicas de <i>Giardia</i> sp., <i>Cryptosporidium</i> sp. y <i>Cyclospora</i> sp.....	<b>74</b>
<b>Tabla 2.</b> Detección de parásitos intestinales en agua y aire de la Bahía de Panamá en época seca del año 2021.....	<b>75</b>
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de parásitos intestinales de interés (Positivos) y el resto de la detección (positivos para otros protozoo y helmintos), en agua y aire de la bahía de Panamá en época seca del año 2021.....	<b>76</b>
<b>Tabla 4.</b> Detección de los parásitos positivos de interés en 12 puntos de la bahía de Panamá en procesos de agua y aire en época seca del año 2021.....	<b>77</b>
<b>Tabla 5.</b> Detección de parásitos intestinales en 12 puntos de la bahía de Panamá en procesos de agua y aire en época seca del año 2021.....	<b>77</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Comparación porcentual de parásitos intestinales de mayor interés (positivos), observados en muestras de agua y aire en temporada seca de la Bahía de Panamá del año 2021.....	<b>78</b>
<b>Figura 2.</b> Espectro parasitario detectado en los 12 sitios de muestreo en la bahía de Panamá durante la época seca de 2021.....	<b>78</b>
<b>Figura 3.</b> Prevalencia de protozoos en muestras de agua y aire en 12 estaciones de muestreo de la Bahía de Panamá.....	<b>79</b>
<b>Figura 4.</b> Detección de parásitos intestinales en 12 puntos de la Bahía de Panamá en muestras de agua durante la época seca de 2021.....	<b>79</b>
<b>Figura 5.</b> Detección de parásitos intestinales en 12 puntos de la Bahía de Panamá en muestras de aire durante la época seca de 2021.....	<b>80</b>
<b>Figura 6.</b> Comparación porcentual de detección según técnica empleada para el diagnóstico de formas parasitarias, en época seca de la bahía de Panamá 2021.....	<b>80</b>
<b>Figura 7.</b> Comparación porcentual de parásitos detectados en muestras de agua y aire, época seca de la bahía de Panamá 2021.....	<b>81</b>

<b>Figura 8.</b> Protozoos de mayor interés detectados en muestras de agua y aire procedentes de la bahía de Panamá, época seca 2021.....	<b>81</b>
<b>Figura 9.</b> Comparación porcentual de parásitos con mayor interés, siendo nuestros positivos, ( <i>Giardia</i> sp., <i>Cyclospora</i> sp. y <i>Cryptosporidium</i> sp.) en comparación del resto detectado (positivos para otros protozoos y helmintos) en muestras de agua y aire, época seca de la bahía de Panamá 2021.....	<b>82</b>
<b>Figura 10.</b> Comparación porcentual de la distribución total por mes de los parásitos intestinales detectados en la época seca de la bahía de Panamá 2021.....	<b>82</b>
<b>Figura 11.</b> Análisis de similitud de Bray-Curtis para los 12 sitios de muestreo de la Bahía de Panamá.....	<b>83</b>
<b>Figura 12.</b> Análisis de similitud de Bray-Curtis para los puntos de muestreo por parásitos de interés (Positivos) detectados de la bahía de Panamá.....	<b>83</b>
<b>Figura 13.</b> Análisis de similitud de Bray-Curtis para los parásitos de interés (Positivos) detectados de la bahía de Panamá.....	<b>84</b>
<b>Figura 14.</b> Ciclo de Vida de <i>Giardia</i> sp.....	<b>85</b>
<b>Figura 15.</b> Ciclo de Vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	<b>86</b>
<b>Figura 16.</b> Ciclo de Vida de <i>Cyclospora</i> sp.....	<b>87</b>
<b>Figura 17.</b> Ubicación satelital de las 12 estaciones de muestreo a lo largo de la Bahía de Panamá, desde Costa del Este hasta la Calzada de Amador.....	<b>88</b>
<b>Figura 18.</b> Los 12 Puntos de muestreos a lo largo de la Bahía de Panamá.....	<b>89</b>
<b>Figura 19.</b> Colecta de muestras de agua en diferentes puntos a lo largo de la Bahía de Panamá, con ayuda de un muestreador.....	<b>90</b>
<b>Figura 20.</b> Colecta de muestras de aire de los diferentes puntos, mediante un Impinger AGI-30 que se encuentra conectado a una bomba de muestreo.....	<b>90</b>
<b>Figura 21.</b> Muestras de agua colectadas en botellas de 2 L a las cuales se les aplicó la técnica de sifoneo para la recolección de sedimentos.....	<b>90</b>
<b>Figura 22.</b> Proceso de filtración de muestras mediante el sistema de filtración al vacío utilizando la bomba millipore.....	<b>91</b>
<b>Figura 23.</b> Proceso de Pre-filtrado de las muestras de a) agua y b) aire, utilizando filtros de membrana.....	<b>91</b>

<b>Figura 24.</b> Muestras preservadas en formalina y glicerol en Falcon de 15 ml y tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml.....	<b>91</b>
<b>Figura 25.</b> Métodos empleados para la observación de las muestras. a) Montaje de Flotación y b) Método directo.....	<b>92</b>
<b>Figura 26.</b> Tinciones aplicadas a las muestras de los diferentes puntos. a)Tinción ziehl neelsen b) Tinción de Giemsa.....	<b>92</b>
<b>Figura 27.</b> Revisión de muestras al microscopio utilizando un método por flotación.....	<b>93</b>
<b>Figura 28.</b> <i>Giardia</i> sp. observado mediante diagnóstico directo en muestra de agua del Mercado del Marisco.....	<b>94</b>
<b>Figura 29.</b> <i>Cyclospora</i> sp. observado mediante diagnóstico directo en muestra de aire en Isla Flamenco.....	<b>94</b>
<b>Figura 30.</b> Ooquiste <i>Cyclospora</i> sp. inmaduro, observado mediante diagnóstico directo en muestra de agua de Coco del Mar.....	<b>94</b>
<b>Figura 31.</b> Huevo de <i>Uncinaria</i> sp. observado mediante diagnóstico directo en muestra de agua de Las Bóvedas.....	<b>95</b>
<b>Figura 32.</b> Huevo <i>Ascaris</i> sp. inmaduro, observado mediante diagnóstico directo en muestras de agua de Coco del Mar.....	<b>95</b>
<b>Figura 33.</b> <i>Taenia</i> sp. observada mediante diagnóstico directo en muestra de agua de Isla Flamenco.....	<b>95</b>
<b>Figura 34.</b> <i>Toxocara</i> sp. observada mediante diagnóstico directo en muestras de agua de Isla Flamenco.....	<b>96</b>
<b>Figura 35.</b> <i>Giardia</i> sp. observada mediante la tinción de Giemsa en muestras de agua obtenidas del Mercado del Marisco.....	<b>96</b>
<b>Figura 36.</b> Quiste de <i>Entamoeba</i> sp. de observado mediante la tinción Giemsa en muestra de agua de Boca La Caja.....	<b>96</b>
<b>Figura 37.</b> <i>Cryptosporidium</i> sp. observada mediante la tinción de Ziehl-Neelsen en muestra de agua de Coco del Mar.....	<b>97</b>

**Figura 38.** *Cyclospora* sp. observada mediante la tinción de Ziehl-Neelsen en muestra de agua de Coco del Mar.....**97**

**Figura 39.** Quiste de *Balantidium coli* observado mediante la tinción de Giemsa en muestra de agua de Costa del Este.....**97**

## **IV. RESUMEN**

## RESUMEN

En este trabajo se analizaron muestras de agua y aire para la detección de protozoos y otros endoparásitos de la Bahía de Panamá durante la estación seca del 2021. Se obtuvieron un total de 36 muestras de agua, y 36 muestras en aire (bioaerosoles) recolectadas mediante un Impinger AQI-30, estableciéndose 12 sitios de muestreo a lo largo de la bahía de Panamá desde Costa del Este hasta la Isla Flamenco. Las muestras fueron procesadas mediante técnicas de Pre filtrado y filtración para la detección de los protozoos en cada muestra, sedimentación (Técnica de Ritchie), flotación (Técnica de Sheather) y para los diagnósticos se utilizaron métodos de montaje directo con Lugol y tinciones diferenciales de Ziehl-Neelsen y Giemsa. En los resultados se reportaron protozoos parásitos como (*Giardia* sp., *Cyclospora* sp., y *Cryptosporidium* sp.) siendo nuestros principales parásitos de interés. Adicionalmente, se reportaron otros endoparásitos como: *Entamoeba coli*, *Taenia* sp., *Blastocystis* sp., *Cystoisospora* sp., y *Ascaris lumbricoides*). El análisis de nuestros resultados indica que la mayor prevalencia de protozoos se dio en puntos como Coco del Mar, Boca la Caja y Mercado de Mariscos, de las técnicas y métodos utilizadas la mejor fue el método directo con un 45%, tinción Ziehl Neelsen 33%, tinción Giemsa 20% y el método Sheather con un 2%. Se puede concluir que la prevalencia de protozoos fue del 87% en las muestras de agua y de 13% en muestras de aire, tal como lo indica la literatura. El mes con mayor prevalencia de parásitos protozoos fue abril.

**Palabras claves:** Bahía de Panamá, agua, aire, bioaerosoles, protozoos, Coccidios, contaminación ambiental, salud pública, Impinger AGI-30.

## ABSTRACT

In this work, water and air samples were analyzed for the detection of protozoa and other endoparasites in the Bay of Panama during the 2021 dry season. A total of 36 water samples (2 L) were acquired and 36 air samples (bioaerosols) collected by Impinger AQI-30, establishing 12 sampling sites along the Bay of Panama from Costa del Este to Flamenco Island. The samples were processed using pre-filtration and filtration techniques for the detection of protozoa in each sample, sedimentation (Technique of Ritchie), flotation (Sheather Technique) and for the diagnoses, direct mounting methods with Lugol and differential staining of Ziehl-Neelsen and Giemsa were used. In these results were report parasitic protozoa such as (*Giardia* sp., *Cyclospora* sp., and *Cryptosporidium* sp.) being our main parasites of interest. Additionally, others such as: *Entamoeba coli*, *Taenia* sp., *Blastocystis* sp., *Cystoisospora* sp., and *Ascaris lumbricoides*) were reported. The analysis of there results indicates that the highest prevalence of protozoa occurred in points such as Coco del Mar, Boca La Caja and Mercado de Mariscos, and of the techniques and methods used, the best was the direct method with 45%, Zielh Neelsen staining with 33%, Giemsa staining with 20% and the Sheather method with 2%. Was concluded that the prevalence of protozoa was 87% in water samples and 13% in air samples, as indicated by the literature. The month with the highest prevalence of protozoan parasites was April.

**Keywords:** Panama Bay, water, air, bioaerosols, protozoa, coccidia, environmental contamination, public health, Impinger AGI-30.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO**

## INTRODUCCIÓN

Los protozoarios son seres vivos microscópicos unicelulares que poseen una gran variedad de formas y tamaños. Son células eucariotas simples, organismos cuyas células tienen membrana nuclear con características del reino animal, ya que son móviles y heterótrofos. Debido a su tamaño pequeño y a la producción de quistes que les permiten resistir a las condiciones medioambientales adversas, muchas especies son Cosmopolitas, mientras que otras son de distribución limitada (Cairns y Ruthven, 1972). Los protozoos parásitos son la mayor causa de las enfermedades infecciosas a nivel global, estos patógenos producen infecciones crónicas. Lo crítico de la interacción lo constituye la evasión a las defensas inmunológicas innatas. Este tipo de evasión sucede cuando un ser vivo (parásito) se aloja en otro de diferente especie (hospedante u hospedero) del cual se alimenta (Gállego Berenger, 2006).

Las parasitosis intestinales se definen como una infección del aparato gastrointestinal causada por protozoarios o helmintos, que afectan a individuos independientemente del estado inmunológico, edad y condición socioeconómica (Botero y Restrepo, 2003). Constituyen un problema de salud pública por las patologías que ocasionan en niños y adultos y su prevalencia, a nivel mundial, representando un signo de alarma, pues están ubicadas dentro de las cinco primeras causas de consultas médicas. Su morbilidad está estrechamente ligada a la pobreza, la inadecuada higiene personal, falta de servicios sanitarios, inadecuado suministro de agua y a la contaminación fecal (González *et al.*, 2018).

Los parásitos protozoarios se caracterizan por permanecer en el ambiente por largos períodos bajo condiciones adversas. Sus formas infectivas son resistentes a la mayoría de los procesos de desinfección química y tratamientos convencionales aplicados en aguas. Además, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y tienen predilección por sitios húmedos con temperaturas que oscilan entre 20°C y 40°C, y debido a esto, son fácilmente recuperados en aguas. En países latinoamericanos el tratamiento y la reutilización de aguas residuales pueden representar un serio riesgo de

salud pública, debido a los altos contenidos de microorganismos patógenos presentes (Pérez G *et al.*, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se presentan 500 millones de casos de diarreas en niños menores de cinco años, entre 3 y 4% de estos casos terminan con *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidias, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli* (Botero y Restrepo, 2003). Las infecciones parasitarias ocasionadas por protozoarios dan origen a diversos procesos gastrointestinales, que suelen ir acompañados por diarreas acuosas o sanguinolentas, dolor abdominal y fiebre. Las diarreas ocupan el tercer lugar entre las principales causas de muerte en niños menores de cinco años, representando así el 17% de todas las muertes a nivel mundial (OMS/OPS, 2004). Se estima que para el 2017, 28 millones de personas carecen de acceso a una fuente de agua mejorada, 83 millones de personas carecen de acceso a instalaciones de saneamiento mejorado, y 15.6 millones practican aún defecación al aire libre (OPS/OMS 2018-2019). El ciclo de vida de estos parásitos se inicia a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados; pueden ser transmitidos en forma vegetativa (trofozoítos) o quística, siendo esta última la forma infectante para el hombre (Botero y Restrepo, 2003).

El agua es un vehículo importante de agentes patógenos causales de diversas enfermedades en el humano, las cuales afectan frecuentemente a la población. Las comunidades rurales a nivel mundial han estado al margen de la verificación de la calidad del agua que utilizan para consumo humano. Existen reportes de comunidades con alta incidencia de enfermedades gastrointestinales y parasitarias, cuyo origen se ha atribuido a la deficiencia en la calidad del agua de pozo que utilizan para consumo (Fuentes *et al.*, 2007). Estadísticas epidemiológicas a nivel mundial señalan que todas las semanas mueren unas 42000 personas a causa de enfermedades relacionadas con la escasa calidad del agua potable y la falta de saneamiento, reportándose que más del 90% de las personas afectadas son niños menores de cinco años (OMS y UNICEF, 2005). En 2018, se calculó que unos 4000 millones de personas (es decir, el 55% de la población mundial) residían en zonas urbanas. Los niños representaban un tercio de esta cifra, y en torno a 300 millones de ellos habitaban en barrios marginales, los peores asentamientos informales (UNICEF, 2019).

Considerando la importancia del agua como uno de los recursos renovables más importantes para el hombre por su utilidad, abundancia y amplia distribución en la naturaleza, la contaminación de ésta con excretas humanas y de animales, favorecen la transmisión de infecciones parasitarias. A fin de determinar la prevalencia de protozoarios intestinales en el agua para consumo humano. El consumo de agua potable contaminada puede transmitir diversidad de patógenos disímiles en cuanto a comportamiento y resistencia. Las enfermedades infecciosas provocadas por agentes patógenos como bacterias, virus y parásitos (por ejemplo, protozoos) constituyen los riesgos para la salud más frecuentes y extendidos relacionados con esta agua (Heredia y Sánchez, 2014).

Las aguas costeras con fines recreativos, por lo general se encuentran en las proximidades de áreas urbanas donde los vertimientos de aguas residuales o sin depurar, con altos contenidos de microorganismos patógenos y otros agentes contaminantes, representan uno de los principales problemas sanitarios y ecológicos de las zonas costeras. El agua residual se vierte en muchas ocasiones directamente a la línea de costa o a través de emisarios submarinos, lo que puede afectar algunas de zonas de importancia turística y pesquera (Borrego y Mariño, 1995).

Una de las enfermedades que pueden causar con la relación de la toma de un agua insegura, son las enfermedades diarreicas que constituyen la tercera causa de muerte entre menores de cinco años en el mundo. Se calcula que más de 340000 niños menores de cinco años, mueren anualmente por enfermedades diarreicas debido a un saneamiento deficiente, siendo casi 1000 niños al día (Cabezas, 2018).

Entre los factores que favorecen la difusión y perpetuación parasitaria se cuentan la contaminación fecal del suelo, el saneamiento ambiental deficiente, el clima, factores socioeconómicos y culturales; y la susceptibilidad del hospedero, determinada por los factores inmunitarios, genéticos y nutricionales de cada persona. Los elementos de saneamiento ambiental, como el agua potable, la eliminación de excretas, basuras y desperdicios, los rellenos sanitarios y el tratamiento de la basura, influyen en la prevalencia de las parasitosis. Uno de los problemas sanitarios más críticos en los países de América Latina y el Caribe, es la descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras. La inadecuada disposición de excretas y la ausencia

o el deficiente sistema de alcantarillado y tratamiento están asociados a la contaminación del agua causando numerosas enfermedades (González *et al.*, 2003).

Panamá, como país tropical y con un gran número de habitantes/Km<sup>2</sup> no escapa de esta realidad, pues las condiciones ambientales tales como las temperaturas cálidas, altos niveles de humedad ambiental, lluvias casi todo el año, una amplia cantidad de vectores mecánicos y reservorios animales domésticos y silvestres, pueden favorecer la permanencia y dispersión de los protozoarios en el ambiente; incluyendo los cuerpos de aguas que sirven de consumo (González *et al.*, 2018).

El Proyecto de Saneamiento de la Bahía de Panamá, comparte protagonismo con otras megaobras. Pero esto, no solo se circunscribe a la mejora del actual sistema de alcantarillados existente, sino que promete devolver la salud a ríos, quebradas y a las aguas de la bahía que por años han estado recibiendo todos los desechos de la ciudad, generando no solo un problema de salud, sino de seguridad.

El agua, el saneamiento y la higiene tienen consecuencias importantes sobre la salud y la enfermedad. La parasitología humana, tradicionalmente, se ha vinculado a las enfermedades tropicales, asociada en su mayoría a condiciones ambientales, poco salubres y muchas veces determinadas por un entorno socioeconómico desfavorable (Gállego, 2006). Los agentes físicos que mayor influencia tienen en la fisiología de los microorganismos son la temperatura, la humedad, las radiaciones y los agentes mecánicos (Pumarola, 1992).

El crecimiento de la población ha incrementado la demanda de agua, por otro lado, el cambio climático nos muestra que las fuentes de agua que antes eran seguras, actualmente, ya no lo son. La causa de estos grandes cambios se debe a la evolución y adaptación de los microorganismos a sus nuevas condiciones en el ambientales donde se desarrollan, tal es el caso de su resistencia a los medicamentos (Botero y Restrepo, 1998). También, existe la interacción de múltiples factores adicionales a los biológicos. Así, por ejemplo, la relación causa-efecto hallada entre los proyectos de desarrollo de acueductos y riego han permitido la introducción de nuevas infecciones (Botero y Restrepo, 1998).

El agua contaminada puede transmitir infinidad de patógenos con comportamientos y resistencias diversas. Dentro de los patógenos a determinar, los parásitos son de

especial relevancia pues se destacan por su alta resistencia a los diversos factores ambientales, además, se encuentran relacionados con altos índices de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo, especialmente en la población infantil. La importancia de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua según su uso y en su relación con el ambiente, es de suma importancia para una buena calidad de vida a largo plazo (Heredia y Sánchez, 2014).

La comprensión de las fluctuaciones estacionales en los patrones de enfermedad e infección es un gran desafío, porque las diferencias estacionales en los picos de infección pueden reflejar diferentes etiologías, heterogeneidad en los hospederos susceptibles y hasta diferencias en las rutas de transmisión. La frecuencia de infecciones con protozoos en general es particularmente mayor en la estación lluviosa que en la seca. También, otro estudio realizado en una población de escolares de Guatemala, reportaron una mayor frecuencia de infecciones con *Entamoeba histolytica* en la época lluviosa. Además, otros autores han reportado resultados similares en este y otros protozoos, en los que las mayores frecuencias de infecciones se hallaron en las temporadas de máximas precipitaciones (Núñez *et al.*, 2013). En América latina, estudios epidemiológicos han mostrado prevalencias parasitarias que varían entre 30% y 53% (Souza *et al.*, 2007).

Según el antropólogo panameño Stanley Heckadon, la ciudad de Panamá ha cambiado por completo la relación con el mar. “Sin duda alguna, el peor cambio que ha sufrido nuestra hermosa bahía fue la decisión tomada a inicio del siglo pasado de arrojar todas las aguas servidas de la capital a sus ríos y al mar. Gradualmente, estos se tornaron en cloacas nauseabundas” (Heckadon, 2013). Aunque, existen pocas investigaciones y documentos científicos que divulgan el rápido y grave deterioro de la calidad de las aguas de los ríos y bahía de Panamá, es evidente la pérdida de la calidad del agua, lo cual ha sido considerado una de las catástrofes ecológicas más costosas de nuestra historia republicana.

Como sabemos, los problemas relacionados con el agua están entre las cuestiones más primordiales a las cuales se enfrenta la población en el presente siglo. Por lo tanto, la evaluación de la prevalencia y concentración de microorganismos en este tipo de material, es necesaria para conocer su calidad y determinar el uso más apropiado que

no genere riesgo para la salud de la población, y daños al ambiente. Es necesario destacar la importancia de la vigilancia sanitaria en la calidad del agua según su uso y en su relación con el ambiente (Heckadon, 2013).

Es por ello, que esta investigación tiene como objetivo determinar los protozoos y otros endoparásitos en muestras de agua y aire de doce puntos ubicados a lo largo de la Bahía de Panamá durante la estación seca del 2021. Además de identificar mediante tinciones diferenciales la prevalencia de *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., en los doce puntos de muestreo, determinar su prevalencia mediante técnicas parasitológicas y por último comparar la prevalencia y frecuencia de protozoos en ambas matrices durante la estación seca de 2021. Y que, a su vez, los resultados que se obtengan aporten una idea del estado actual de las matrices (agua y aire de la Bahía) con la finalidad de aportar datos científicos que ayuden a las autoridades en la toma de decisiones con el objetivo de fortalecer los programas de Saneamiento Ambiental que contribuyan a mejorar la calidad de las aguas costeras y aire de la Bahía de Panamá y así, aportar una mejor calidad de vida a la población panameña.

## MARCO TEÓRICO

### 1. GENERALIDADES DEL REINO PROTOZOO

Los protozoarios son organismos unicelulares eucariontes microscópicos su tamaño varía de 3 a 100 micras—, sin pared celular rígida, móviles, no fotosintéticos y que se nutren de otros seres vivos; esto los distingue de las bacterias (procariotas), las algas (fotosintéticas) y los hongos (no móviles y con pared rígida). Su reproducción puede ser asexual por bipartición o sexual por isogametos o conjugación, para el intercambio del material genético. Los protozoarios parásitos se caracterizan por establecer relaciones simbióticas con otros organismos vivos –incluidos los seres humanos– y llegan a causarles enfermedades tales como amebiasis (*Entamoeba histolytica*), enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), leishmaniasis (*Leishmania*) y paludismo o malaria (*Plasmodium*), entre otras (Martínez, *et al.*2017).

Dentro de los protozoos parásitos animales existen grupos, como los Apicomplexa, donde todos integrantes son formas parásitas. Otros grupos están formados por formas de vida libre y de vida parasitaria; tal es el caso de los flagelados, de los cuales la 6ª parte son parásitos y el resto son formas de vida libre. El hábitat de los protozoos es muy amplio. Los de vida libre pueden estar en el suelo, agua, etc., mientras que otros pueden actuar en simbiosis y comensalismo con animales (por ejemplo, determinados protozoos ciliados que viven en la panza de los rumiantes sin causar ningún problema). Los protozoos parásitos pueden ser transmisores de ciertas enfermedades o productores de enfermedades en animales por sí mismos. Algunos de los más patógenos son *Plasmodium*, agente causal de la malaria y *Trypanosoma*, productor de grandes pérdidas en la ganadería (Martínez, *et al.*2017).

La adaptación de un protozoario a su hospedero resulta en cambios fisiológicos y morfológicos que le permiten sobrevivir a lo largo de su ciclo de vida. Algunos protozoarios parásitos requieren de un solo hospedero (monoxenos); y otros, de varios (heteroxenos). En el último caso, un hospedero actúa como intermediario o reservorio que transmite al parásito y otro como hospedero definitivo en donde ocurre la

reproducción sexual y se desarrolla la patogenia de la enfermedad. La transmisión desde el reservorio hacia el hospedero susceptible puede darse de manera directa, por ejemplo, *Trichomonas vaginalis*, o indirecta por ingestión, por ejemplo, *Entamoeba histolytica* y *Giardia duodenalis* (Manning & Sarabia, 2017).

## 1.1 Morfología

Los protozoos están rodeados de una membrana plasmática que, además de su actividad limitante y receptora, es capaz de controlar, de manera selectiva la entrada y salida de moléculas y materiales. En los protozoos parásitos, así como en la mayoría de las células animales, la superficie se halla recubierta por una envoltura glicoproteica, denominada glucocálix, una capa activa que protege a la membrana y que está formada por glucoproteínas, glucolípidos y polisacáridos. En algunos grupos protozoos, la glucocálix constituye el complejo antigénico principal del parásito, que es de gran importancia en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Navone *et al.*, 2018).

Al microscopio electrónico, la membrana plasmática se observa que está formada por de tres capas porque la porción lipídica central (electro lúcido) está demarcada por las capas interna y externa de naturaleza proteica (electrodensas). En las formas de resistencia de muchos protozoos (quistes, ooquistes) puede existir además una membrana quística o de resistencia, que se forma por aposición de materiales citoplasmáticos a la membrana plasmática (Navone & Venturini, 2018).

Bajo la membrana plasmática se encuentra el citoplasma constituido por dos partes: una, contenida dentro del sistema de endomembranas: núcleo, Retículo Endoplásmico y Complejo de Golgi, y otra, la sustancia exterior al sistema de membranas, o citosol, que es un líquido con alto contenido en proteínas y enzimas y con características propias de un coloide responsables de las variaciones de viscosidad, movimiento intracelular, movimiento ameboide. En esta matriz citoplasmática se localizan los elementos estructurales: citoesqueleto y orgánulos de membrana. El citoesqueleto está constituido por microtúbulos, microfibrillas y micro trabéculas que forman un armazón en el que se sostienen las proteínas estructurales, enzimas y ribosomas. Los orgánulos de membrana son estructuras más o menos permanentes, de origen diverso y con funciones definidas,

que se encuentran formados por membranas (Navone & Venturini, 2018), son las siguientes:

- a) **Mitocondrias:** Son orgánulos presentes en todos los protozoos anaerobios que proporcionan la energía para las actividades biosintéticas y motoras de los protozoos. En su interior presentan crestas cuyo número, y por tanto su superficie, varía según las necesidades fisiológicas del protozoo. De los protozoos de importancia parasitaria, los microsporidios, los diplomonádidos y *Entamoeba histolytica*, entre otros, carecen de mitocondrias. Los kinetoplástidos y apicomplejos solamente presentan una mitocondria. En los primeros, el ADN mitocondrial se concentra en una región subterminal y muy desarrollada, próxima a la base del flagelo, denominada kinetoplasto (da nombre al orden Kinetoplastida), (Navone *et al.*, 2018).
- b) **Lisosomas:** Son depósitos que contienen enzimas hidrolíticas elaboradas por los ribosomas del retículo endoplásmico que se utilizan para la digestión intra o extracelular. En el interior de ellos el material es progresivamente digerido por las enzimas que contienen. Si el material procede del exterior, se habla de heterofagosoma; si pertenece a la propia célula, citolisosoma, o autofagosoma. Cuando la digestión es incompleta, se forman cuerpos residuales que se excretan.
- c) **Vacuolas:** Son vesículas que pueden ser permanentes (como las contráctiles o pulsátiles con función osmorreguladora) o bien formarse en un momento determinado. Dentro de estas últimas se encuentran las vacuolas digestivas, que se originan por invaginación y posterior estrangulación a nivel de una determinada porción de la membrana plasmática. Convencionalmente se dividen en vacuolas digestivas fagocíticas, que incluyen partículas alimentarias grandes, y en pinocíticas, cuyo contenido suele estar constituido por materiales alimentarios invisibles en disolución.

En las células eucariotas, el núcleo, y por tanto el ADN que contiene los genes, está separado del citoplasma por la envoltura nuclear. En su interior puede presentar uno o varios nucléolos con un alto contenido en ARN y proteínas (Navone *et al.*, 2018).

## 1.2 Movilidad

El movimiento en los protozoos puede producirse por tres mecanismos: por pseudópodos o flagelos, cilios y arrastre o gliding.

- a) Pseudópodos:** Son estructuras temporales capaces de arrastrar el cuerpo del protozoo en una determinada dirección, así como englobar sustancias para la fagocitosis. Es el tipo más simple de locomoción, propio de los
- Sarcodinos. Atendiendo a su morfología los pseudópodos pueden ser:
  - Lobópodos: son pseudópodos anchos, gruesos, redondeados y no muy grandes que se presentan en número escaso; son propios de las amebas.
  - Filópodos: largos, filiformes y numerosos.
  - Rizópodos: son finos, ramificados y anastomosados, y en ellos destaca una porción interna reticular y una externa más fluida por la que circulan gránulos. Axópodos: se disponen radialmente, y son más o menos rígidos, largos y sin ramificar.
- b) Cilios:** Son filamentos cortos y muy numerosos, el desplazamiento se produce gracias al movimiento de estas estructuras y las membranas ondulantes asociadas. Presentan una estructura interna compleja pero análoga a los flagelos, los cuales también se relacionan con citoesqueleto y centriolos. El *Paramecium* es un representante muy popular del grupo.
- c) Arrastre o Gliding:** Es el tipo de locomoción más frecuente entre los protozoos. Se realiza mediante contracciones y extensiones del cuerpo del protozoo en prevalencia de un determinado sustrato a manera de un acordeón. En él participan una serie de microtúbulos subpeliculares que producen volteo, deslizamiento o doblamiento. Es el movimiento típico de los Apicomplexa (Gos *et al.*, 2018).

## 1.3 Metabolismo

Los protozoos parásitos son heterótrofos, es decir, el material que precisan lo obtienen del medio en el que viven. Desarrollan una nutrición holozoica mediante ingestión de sustancias de otros organismos o de ellos mismos. La incorporación de sustancias puede

hacerse mediante estructuras temporales o permanentes semejantes a una boca, o a través de la membrana plasmática. En este último caso se denomina nutrición saprozoica. La nutrición saprozoica puede producirse por difusión directa o simple difusión, cuando lo permite el gradiente de sustancias en disolución que se encuentran en el exterior de la célula, por difusión auxiliar, gracias a proteínas globulares intercaladas en la bicapa lipídica, que fijan los nutrientes y los introducen en el citoplasma, o por transporte activo, mediante un proceso enzimático que conlleva un gasto energético (Falcone *et al.*, 2018).

La ingestión de partículas sólidas se realiza mediante fagocitosis, en cualquier parte de la superficie del cuerpo, como ocurre en las amebas, o en una región o área determinada denominada citostoma. Las sustancias no absorbibles o no digeridas se eliminan al exterior por cualquier punto de la superficie corporal, mediante una abertura temporal, o por un área de excreción concreta llamada citopigio. Cuando la sustancia ingerida es líquida, el proceso es una fagocitosis particular llamada pinocitosis.

## **2 PROTOZOOS DE INTERÉS**

### **2.1 *Giardia* spp.**

#### **2.1.1 Generalidades y Morfología**

Es un protozoo flagelado, perteneciente al filo Metamonada. Su ciclo de vida comprende dos estadios: la forma vegetativa móvil, que parasita el intestino delgado (trofozoíto) y la forma de vida libre e infectante (quiste). Morfológicamente los quistes son ovalados o redondeados de 11-14 micras de longitud por 7-10  $\mu$  de anchura, con cuatro núcleos, axonemas y cuerpos medios, con un metabolismo basal o reducido. Por otro lado, los trofozoitos, de forma piriforme, miden de 12-15  $\mu$  de longitud por 5-9  $\mu$  de anchura. Poseen un disco ventral con el cual se adhieren a las microvellosidades de las células del epitelio duodenal y 8 flagelos (2 anteriores, 2 ventrales, 2 posteriores/laterales y 2 caudales), 2 axonemas y 2 cuerpos mediales. Poseen 2 núcleos aparentemente iguales, y cada uno alberga 5 cromosomas (Ankarklev *et al.*, 2010).

Es una de las principales causantes de enfermedad gastrointestinal en todo el mundo, afectando a millones de personas, y reconocida entre las causas más frecuentes de las llamadas diarreas de los viajeros. Siendo señalada como una de las causas de mortalidad

más importantes en los países en desarrollo en los años 90 y es uno de los parásitos más detectado en los países desarrollados (Thompson *et al.*, 2000). Así, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América (EEUU) informa de que casi un tercio de la población de países en desarrollo ha padecido giardiasis y en los países desarrollados, ha afectado al 2% de la población adulta, y entre el 6-8% de la población infantil. A pesar de todo ha sido incluida por la OMS dentro del grupo de las enfermedades olvidadas (Savioli *et al.*, 2006). Esta produce desde infecciones asintomáticas a cuadros graves diarreicos que se presentan de manera intermitente y a veces se cronifican, con dolor abdominal, malabsorción y pérdida de peso. En algunos casos la enfermedad evoluciona de manera espontánea hacia la curación, pero en otros, persiste e incluso se han encontrado resistencias al tratamiento farmacológico (Gardner y Hill, 2001).

### **2.1.2 Ciclo Biológico**

El ciclo biológico es sencillo (ciclo directo monoxeno), con solo dos estadios, el quiste y el trofozoito. El ser humano se infecta tras la ingestión del quiste vehiculado por el agua o alimentos contaminados con heces de animales o personas que han padecido la infección, o directamente por la ruta fecal-oral de persona a persona o contacto entre animales, en su caso. Una vez en el estómago, los ácidos gástricos y las enzimas pancreáticas disparan los mecanismos de desenquistamiento del trofozoito en el duodeno, resultando de cada quiste 4 trofozoitos, los cuales se replican asexualmente mediante fisión binaria de forma repetida, hasta que la acción de las sales biliares, disminución del colesterol y cambio a pH básico en el medio, provocan de nuevo su enquistamiento, para salir al exterior y diseminarse con las heces. Los quistes presentan un alto grado de resistencia al medio externo e incluso a la acción de determinados desinfectantes (es más resistente a los desinfectantes oxidantes como el cloro que ciertas bacterias, de forma que a dosis de 1 ppm se necesitan cerca de 30 min para la inactivación del 90% de los quistes) (OMS, 2002), lo cual hace que sean uno de los patógenos de transmisión hídrica más importantes en países desarrollados (Slifko *et al.*, 2000). Los quistes perduran desde semanas a meses en el medio ambiente, en función de las condiciones climatológicas externas, y son infectantes de inmediato. La dosis

infectiva para el ser humano es relativamente baja, de 10 a 100 quistes (Rendtorff, 1954). Y aunque durante la fase aguda de la diarrea pueden excretarse trofozoitos al medio externo, no parecen tener ningún papel epidemiológico, por su escasa resistencia a las condiciones ambientales y su sensibilidad al pH gástrico (Flanagan, 1992), (**Ver figura 14**).

### **2.1.3 Sintomatología clínica**

Los síntomas que desarrollan los individuos infectados van a depender de la virulencia del aislado, la carga parasitaria y la respuesta inmunitaria. Pero una alta proporción no desarrollará sintomatología, cerca del 50% (Leder y Weller, 2014), aunque, pueden diseminar quistes mediante sus heces, actuando como portadores asintomáticos.

La sintomatología más frecuente suele cursar con diarrea maloliente, en alta proporción esteatorrea, y malestar general, flatulencia, hinchazón y calambres abdominales, así como náuseas. En menor proporción aparecen vómitos y fiebre. En la mitad de los pacientes con sintomatología aguda, hay una pérdida de peso significativa, probablemente relacionada con la diarrea, malabsorción, y la inapetencia (Leder y Weller, 2014). Los síntomas pueden presentarse durante 2 a 4 semanas, tras un período de incubación de 7 a 14 días.

Por otro lado, la sintomatología crónica podría aparecer per se, o bien, ser consecutiva a un episodio agudo, apareciendo de una manera continuada, de manera intermitente o esporádica, e incluso de forma recurrente. Destacando la pérdida de peso. No suele presentarse diarrea, pero si heces sueltas. También aparecen otros síntomas similares a la fase aguda, como esteatorrea, malabsorción, malestar general, fatiga, borborigmos, flatulencia, dolor abdominal. Los síntomas pueden ser recurrentes durante un periodo de varios meses.

Otra complicación de la giardiasis es una aparición de intolerancia a la lactosa, que agrava los síntomas digestivos, y que puede perdurar incluso tras haber eliminado al parásito del cuerpo. También se señalan otras patologías del colon, como inflamación de este, colon irritable. Fatiga crónica, retraso en el crecimiento de los niños, etc. La mortalidad es muy rara, pero no descartable, especialmente en niños, si ocurre una fuerte deshidratación y existen problemas previos de malnutrición (Anónimo, 2012).

#### **2.1.4 Diagnóstico**

Se han utilizado diversas técnicas para detectar la prevalencia de *Giardia* spp. La microscopía en materia fecal ha sido muy usada, con observación directa de trofozoitos o formas quísticas de *Giardia*, pero dado que la excreción de estas últimas puede ser intermitente, no pueden descartarse errores diagnósticos, por lo que se recomienda análisis seriados durante al menos 1-2 semanas (Leder y Weller, 2014).

Las técnicas de detección de antígenos presentan mayores ventajas que las anteriores, por su sensibilidad y ahorro en tiempo. Técnicas como la inmunofluorescencia directa, inmunocromatografía o enzimoimmunoanálisis (ELISA), son hoy en día ampliamente usadas en laboratorios convencionales. Otras técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos (PCR) permiten realizar diagnósticos simultáneos entre varios agentes patógenos causantes de diarreas, además, de detectar distintos genotipos de *Giardia*. Un estudio más pormenorizado de las mismas puede consultarse en el artículo de (Koheler *et al.*, 2014).

#### **2.1.5 Tratamiento**

Varias drogas se utilizan para eliminar a *Giardia*, destacando Metronidazol como uno de los fármacos de primera elección. Otros fármacos ampliamente usados son Tinidazol y Nitazoxanida. Aunque no se pueden descartar los posibles efectos secundarios o la aparición de resistencias adquiridas (Gutiérrez *et al*, 2013). El Mebendazol, Albendazol, Paramomicina, Furazolidona, o Quinacrina se utilizan como tratamientos alternativos cuando no se muestran efectivos los primeros o existe algún tipo de contraindicación (Gutiérrez *et al*, 2013).

### **2.2 *Cryptosporidium* spp.**

#### **2.2.1 Generalidades y Morfología**

*Cryptosporidium* spp. es un protozooario parásito perteneciente al Phylum Apicomplexa, intracelular obligado, monoxeno, con fases de reproducción sexual y asexual que ha sido ampliamente estudiado en la escala de vertebrados, incluida la especie humana. Se ha establecido que sus ooquistes son los más pequeños de los coccidios y se describen dos

tipos: uno de pared gruesa que sale al exterior con las heces, resistente y transmisible por vía oral y el otro de pared delgada que posee una unidad de membrana simple, responsable de la infección endógena o autoinfección (Fayer, 2004).

Los estadios del ciclo de vida del parásito incluyen ooquistes maduros e inmaduros, esporozoítos, trofozoítos, esquizontes tipo I (de primera generación), esquizontes tipo II (de segunda generación), merontes o gamontes, merozoítos, progametocitos que son los precursores de las células sexuales diferenciadas, llamadas microgametocitos y macrogametocitos además de cigotos. Actualmente se acepta que el género *Cryptosporidium* incluye aproximadamente 15 especies (Goebel *et al.*, 1982).

Este parásito es el causante de la criptosporidiosis, enfermedad considerada principalmente una parasitosis gastrointestinal cuya principal vía de contagio es la fecal-oral siendo el agua un importante agente para su diseminación. En esta infección el estado inmunológico del individuo afectado es fundamental, siendo las especies pertenecientes a este género responsables de cuadros gastrointestinales y la severidad va a depender de varios factores: del hospedador, como son competencia inmunitaria, edad y estado nutricional, del número de parásitos causantes de la infección y del medio ambiente, ya que los ooquistes mantienen su infectividad durante un tiempo relativamente largo (Fayer, 2004).

### **2.2.2 Ciclo Biológico**

Los ooquistes de *Cryptosporidium* presentan una pared muy dura, lo que les permite sobrevivir fuera del cuerpo durante largos periodos y hace que sean muy resistentes a los desinfectantes físicos –como las radiaciones gamma– y químicos –como el cloro–. Por ejemplo, para eliminar a este parásito se requiere una concentración mayor de 80 mg/l de cloro en agua, la cual supera por mucho la concentración permitida por la Secretaría de Salud, que es de 0.2 a 1.5 mg/L de cloro en agua para uso y consumo humano. El ciclo de vida de este parásito comienza con la ingesta de un pequeño número de ooquistes –tan sólo 30– que pueden provocar la infección. Dentro del individuo estos huevecillos se rompen en el tracto digestivo y se liberan cuatro esporozoítos que van a infectar a las células intestinales. Dentro y en la superficie de estas células se llevan a cabo diversas transformaciones; el parásito pasa por otras fases de vida asexual y

sexual, hasta que finalmente el ooquiste maduro es expulsado con las heces y está listo para infectar a otros individuos (Fayer, 2004), **(ver figura 15)**.

### **2.2.3 Sintomatología clínica**

Tras un periodo de incubación que oscila entre 5 y 28 días, el síntoma más frecuente es la diarrea, que puede ser de tipo colérico y en algunos casos hay prevalencia de moco en las heces. Otros síntomas son dolor abdominal, náuseas, fiebre, astenia. Las manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis intestinal están directamente relacionadas con el estado inmunológico del hospedador. Así, en el individuo inmunocompetente se presenta como una diarrea autolimitada, que en algunos casos puede ser de gran intensidad, que generalmente dura de una a dos semanas, pero que se resuelve sin tratamiento específico. Todo lo contrario, ocurre en el sujeto inmunocomprometido, quien desarrolla una diarrea crónica que puede comprometer su vida. *Cryptosporidium* produce una forma de diarrea acuosa que pone en peligro la vida de individuos con SIDA. Los pacientes pueden perder hasta 17 L de líquido intestinal al día. Su persistencia después de eliminar la ingestión oral y la infrecuente prevalencia de eritrocitos y leucocitos hablan a favor de la posibilidad de un mecanismo secretor mediado por una toxina. En los casos de inmunosupresión grave, el microorganismo invade el conducto biliar y produce fiebre, ictericia, dolor en hipocondrio derecho y vómito. En casos poco frecuentes, los pacientes con SIDA padecen criptosporidiosis pulmonar, colecistitis alitiásica e incluso pancreatitis (Vela y Vásquez, 1995).

### **2.2.4 Diagnósticos**

El diagnóstico clínico de la criptosporidiosis intestinal es difícil porque existen pocas características diferenciales de otras patologías diarreicas, por lo que debe confrontarse con otras posibles etiologías de diarrea acuosa y, entre las más frecuentes a considerar tenemos las producidas por: *Giardia intestinalis*, *Isospora belli*, *Ciclospora cayetanensis*, *Microsporidium*, rotavirus, otros virus entéricos y *E. coli* enterotoxigénica. Como en otras infecciones parasitarias, la eliminación de los ooquistes puede ser intermitente o muy baja en infecciones subclínicas. Los estudios realizados para determinar el número de muestras a estudiar para minimizar el número de falsos negativos reportaron una serie

de tres muestras para el sujeto inmunocompetente, y en el caso de pacientes inmunocomprometidos, como sería en el caso de pacientes con SIDA, sería suficiente el estudio de dos muestras (Fayer, 2004).

El método de preferencia consiste en concentrar los microorganismos en muestras de heces por técnica de flotación y después identificarlos por microscopía de contraste de fase o métodos de tinción. Las tinciones estándar para protozoarios intestinales no tiñen *Cryptosporidium* de manera adecuada, por lo cual las muestras se tratan con tinción ácida, tinción de auramina-rhodamina o anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína. El diagnóstico se efectúa por demostración de ooquistes en la muestra fecal, para lo cual se procede a la coloración del extendido fecal por el método de Ziehl Neelsen modificado o de Kinyoun. Estas técnicas son las más ampliamente usadas y generalmente, son las de elección por el laboratorio de diagnóstico clínico y facilitan la identificación, diferenciando los ooquistes de las levaduras, que tienen forma y tamaño similar; los ooquistes se tiñen de rojo por ser ácido-alcohol resistente, mientras que las levaduras no toman esta coloración. También se ha utilizado una nueva técnica de tinción tricrómica y ácido alcohol para la detección simultánea de *Cryptosporidium* y especies de *Microsporidias* en heces (Henriksen *et al.*, 1981).

Se han desarrollado técnicas rápidas de inmunoanálisis enzimático (ELISA) e inmunofluorescencia directa, las cuales son de gran utilidad diagnóstica. Se trata de métodos con alta sensibilidad y especificidad en casos de heces diarreicas, pero tiene uso limitado para estudios epidemiológicos y diagnóstico de casos asintomáticos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) caracterizada por su gran sensibilidad y especificidad, es de gran utilidad para el diagnóstico y estudios taxonómicos, aunque su uso está restringido a algunos laboratorios (Henriksen *et al.*, 1981).

### **2.2.5 Tratamiento**

En la actualidad no se dispone de un fármaco que sea realmente eficaz para el tratamiento de la criptosporidiosis en humanos y animales. En las personas inmunocompetentes la enteritis por *Cryptosporidium* spp. Es autolimitada por lo que se requiere tratamiento de soporte y sintomático. La rehidratación oral o intravenosa, con o sin nutrición parenteral, generalmente es suficiente. Se han utilizado antibióticos y

quimioterápicos, coccidiostáticos, antivíricos, antidiarreicos, inmunoterapia e inmunomoduladores (Vela *et al.*, 1995).

La eficacia de las drogas utilizadas con actividad preventiva o curativa es limitada o dudosa, especialmente para el tratamiento de la criptosporidiosis extraintestinal. Generalmente, los pacientes con inmunidad normal no requieren tratamiento específico y cuando se estén administrando inmunosupresores pudiera estar indicado suprimirlos. En pacientes inmunocomprometidos se ha utilizado espiramicina, la cual puede ser transitoriamente eficaz. La paromomicina antibiótica del grupo de los aminoglucósidos, con escasa absorción por la vía gastrointestinal, parece ser prometedor en el tratamiento de la criptosporidiosis. Un estudio controlado del tipo placebo y doble ciego, utilizando la paromomicina en pacientes con criptosporidiosis intestinal y SIDA, demostró su eficacia para reducir la sintomatología y la excreción de ooquistes. Otros informes de casos clínicos y estudios no controlados describen mejoría clínica con la paromomicina, pero también reportan recaídas, especialmente si no se continúa con tratamiento de mantenimiento (Vela *et al.*, 1995).

### ***Cyclospora* spp.**

#### **2.2.6 Generalidades y Morfología**

Es un protozoo intestinal humano, que causa ciclosporiasis (o también ciclosporiasis) y pertenece al filo Apicomplexa, subclase Coccidiasina. La infección es endémica en el mundo, principalmente en países tropicales y subtropicales de Latinoamérica y Asia. El coccidio se transmite a través de la ingestión de agua y alimentos contaminados. No se ha descrito la transmisión persona a persona. Las diarreas asociadas a *Cyclospora* han sido descritas tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados, lo que sugiere la distribución cosmopolita de este organismo. Sin embargo, en muchos de los casos descritos en los países desarrollados, existe el antecedente epidemiológico de estancias recientes en países en vías de desarrollo (Ortega *et al.*, 2010).

Por otro lado, este parásito ha sido identificado tanto en individuos sanos como en pacientes sintomáticos inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Los estudios de prevalencia son limitados y muestran variaciones dependientes del área geográfica, del periodo de estudio y del tipo de población. Además, ponen de manifiesto la existencia de

portadores asintomáticos y el hecho, anteriormente comentado, de que los casos aislados descritos en los países desarrollados se relacionan con estancias en países tropicales y subtropicales. En dichas áreas geográficas parece existir una asociación estacional entre la aparición de brotes diarreicos producidos por este organismo y los meses cálidos del año (Ortega *et al.*, 2010).

### **2.2.7 Ciclo Biológico**

La forma infectiva son los ooquistes, que se encuentran en el exterior. Estos son esféricos, de unas 8-10 micras de diámetro y están rodeados de una pared doble rígida. Los que están esporulados contienen dos esporoquistes, que a su vez contienen dos esporozoítos. Su ciclo de vida es directo. Es un ciclo muy complejo, con alternancia entre ciclos de reproducción asexual (esquizogonia o merogonia) y sexual (gametogonia y esporogonia), que se realiza en el intestino de un hospedador humano. El ciclo asexual (esquizogonia) se inicia tras la ingestión de los ooquistes maduros por el hospedador. Los ooquistes en el intestino del hospedador liberan los esporozoítos. Estos se fijan y penetran en las células del epitelio intestinal del hospedador y se dividen en el interior de la célula (división esquizogónica) dando lugar a los merontes tipo I, con 8-12 merozoítos. Después, los merozoítos son liberados e infectan nuevas células intestinales en las que, tras varias divisiones esquizogónicas, en un momento dado, la división esquizogónica genera merontes tipo II, con 4 merozoítos gamontes o gametocitos; se inicia así, el ciclo sexual. Los gamontes se liberan a la luz intestinal y penetran en nuevas células intestinales del hospedador en las que se diferencian en los distintos gametos, femenino y masculino. Posteriormente ocurre la fecundación que da lugar al ooquiste que se libera a la luz intestinal y es expulsado al exterior con las heces del hospedador. Los ooquistes liberados con las heces son inmaduros; en el exterior, durante 1-2 semanas con temperaturas de 23-27°C, se produce su maduración o esporulación con la formación de dos esporoquistes que contienen dos esporozoítos en su interior (Ortega *et al.*, 2010), **(ver figura 16)**.

### **2.2.8 Sintomatología clínica**

En los individuos inmunocompetentes, la infección sintomática presenta características similares a las de cualquier patógeno no invasor del intestino delgado, con un perfil sindrómico indiferenciable del de otros coccidios intestinales. El periodo de incubación es variable, de 1 a 14 días, aunque por término medio suele ser de una semana. Los pródromos, de 1 a 2 días de duración, consisten en malestar general y febrícula (Weitzel *et al.*, 2013).

La fase de estado se caracteriza por la aparición abrupta de diarrea acuosa, con 5 a 10 deposiciones diarias, acompañada de astenia, anorexia, náuseas, vómitos, flatulencia y, ocasionalmente, de dolor abdominal, esteatorrea, malabsorción de D-xilosa, y mialgias. La diarrea inicial dura de tres a cuatro días, pero a los pocos días, y durante varias semanas, aparecen episodios diarreicos intermitentes, de intensidad variable, que pueden determinar una pérdida de masa corporal del 5 al 10%. En los periodos no diarreicos se mantienen la astenia y la anorexia. La duración de la diarrea es muy variable, oscilando entre 4 y 107 días, con una media de cuatro a nueve semanas. La resolución de los síntomas se produce de forma abrupta y se asocia con la desaparición de los ooquistes fecales. En los pacientes inmunodeprimidos, el cortejo sintomático es similar al observado en los pacientes inmunocompetentes, aunque, a diferencia de éstos, en los que el proceso es autolimitado, en los primeros es más insidioso y prolongado en el tiempo, con tendencia a la cronificación, y siempre revistiendo una mayor gravedad (Weitzel *et al.*, 2013).

### **2.2.9 Diagnóstico**

El diagnóstico de laboratorio de la ciclosporiasis es directo, y se basa en la observación microscópica de los ooquistes inmaduros en preparaciones húmedas, o en tinciones diferenciales, realizadas a partir de heces frescas o conservadas. Es aconsejable la concentración fecal, mediante centrifugación, Ritchie modificado, o flotación, sacarosa de Sheather, en muestras seriadas de heces, dada la baja o moderada, e incluso discontinua, excreción de ooquistes. En las preparaciones húmedas, los ooquistes de este organismo se observan como esférulas de 8-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, hialinas, no refráctiles, con una mórula formada por 6 a 9 glóbulos refráctiles verdosos. Las tinciones

diferenciales se utilizan para demostrar la característica ácido-alcohol resistencia de los ooquistes de este organismo. Mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, los ooquistes se observan como estructuras esféricas de 8 a 10  $\mu\text{m}$ , unas veces incoloras, otras de color rosado o rojo intenso de aspecto moteado, mientras que con fluorocromos aparecen como esférulas de pared fluorescente, en grado variable (Weitzel *et al.*, 2013).

### **2.3.5 Tratamiento**

El tratamiento de elección para la ciclosporiasis consiste en la administración de trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMX) de doble potencia: 160 mg TMP y 800 mg SMX por vía oral 2 veces al día durante 7 a 10 días. Los niños deben recibir 5 mg/kg de TMP y 25 mg/kg de SMX por vía oral 2 veces al día durante el mismo número de días. En los pacientes con sida, pueden ser necesarias dosis más altas y mayor duración y, tras el tratamiento de la infección aguda, suele ser necesaria una terapia supresora a largo plazo. Es importante la iniciación o la optimización de la terapia antirretroviral. La ciprofloxacina (500 mg por vía oral dos veces al día durante 7 días) es una alternativa a la TMP/SMX. La nitazoxanida (100 mg dos veces al día durante 3 días) es una alternativa a la TMP/SMX en pacientes con intolerancia a la sulfonamida e infecciones resistentes a la ciprofloxacina. Se informa que la eficacia de la nitazoxanida oscila entre 71 y 87% en la ciclosporiasis. La prevención consiste en tomar precauciones para la manipulación de alimentos y agua durante el viaje en áreas endémicas y evitar alimentos potencialmente contaminados durante los brotes. En las regiones endémicas, el agua de consumo debe hervirse o clorarse, debe evitarse el consumo de fruta no pelada y la verdura debe cocerse adecuadamente (Weitzel *et al.*, 2013).

## **3 MÉTODOS DE OBSERVACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO Y DIFERENCIACIÓN DE *GIARDIA SPP.*, *CYCLOSPORA SPP.* Y *CRYPTOSPORIDIUM SPP.***

Las infecciones por parásitos intestinales constituyen un importante problema de salud pública en todo el mundo por sus altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial, en particular en las regiones tropicales y subtropicales de los países en vía de desarrollo. Se estima que alrededor de 480 millones de personas sufren de amebiasis y otras infecciones causadas por diversos protozoos intestinales, incluyendo a *Giardia lamblia*,

*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis*, entre otros, que pueden causar diarreas autolimitadas en individuos inmunocompetentes (Núñez, 2004). Una de las técnicas de referencia más utilizada en los laboratorios para la detección de quistes de estos protozoos es la observación directa bajo el microscopio utilizando el método por concentración o técnica de Ritchie (centrifugación con formol-éter), debido principalmente a su bajo costo y a la sencillez de la prueba. Sin embargo, la identificación por microscopía tradicional requiere tiempo, experiencia, además de ser poco sensible e inespecífica, ya que los quistes pueden confundirse con otros parásitos que presentan morfología semejante (González *et al.*, 1999).

Examen coproparasitológico: nos informa desde características macroscópicas como la consistencia, la prevalencia de sangre, moco y parásitos observables a simple vista o partes de estos como las proglótides de las tenías. La observación microscópica arroja datos importantes que hacen pensar en un proceso inflamatorio agudo como la prevalencia de leucocitos abundantes, glóbulos rojos, cristales de Charcot Leyden que aparecen por destrucción de eosinófilos en intestino, glóbulos de grasa relacionados con problemas de absorción, la prevalencia de levaduras, el pH de las heces fecales y principalmente la descripción de las formas parasitarias encontradas, cantidad y características tintoriales.

Exámenes coproparasitológicos mediante técnicas de concentración: existen varias técnicas de concentración, las más aplicadas generalmente son las de flotación por diferencia de densidades entre la solución y los huevos o quistes que son más livianos y terminan flotando en la solución preparada (técnica de Willis) y la técnica de Ritchie, consistente en la centrifugación y aplicación de soluciones de diferentes densidades que buscan concentrar a las formas parasitarias, esta técnica toma más tiempo pero tiene mayor sensibilidad y especificidad que la anterior.

La técnica de sedimentación espontánea en tubo demostró que puede mejorar el rendimiento de estas pruebas hasta en un 50% comparadas con el método directo (23%) y el de flotación (25%), por lo que puede solicitarse al laboratorio cuando uno desea que se realicen pruebas por concentración. Tiene como gran ventaja que su costo es mucho menor y con menos riesgo para el personal de laboratorio una vez que no utilizan éter o formol.

Tinciones permanentes: Son utilizadas cuando existen dudas diagnósticas y es necesario identificar las características morfológicas del parásito, caso típico de las semejanzas entre la *Entamoeba histolytica* y la *Entamoeba coli*; las más utilizadas son la tricrómica y la hematoxilina férrica.

#### **4 DE LOS CICLOS DE VIDA Y LAS VARIACIONES EN EL CLIMA**

Los ciclos de vida son complejos en algunos de ellos, ya que presentan etapas con reproducción asexual y otras en forma sexual. En general, cuando se mueven libremente se denominan trofozoítos y cuando están en etapa de resistencia en quistes o protegidos dentro del citoplasma de los macrófagos se denominan amastigotes (Forgber *et al.*, 2006). Algunos realizan parte de su ciclo en vectores que los transmiten a otros animales o al hombre. Los vectores pueden ser animados, como mosquitos o garrapatas o inanimados, como el agua de bebida o de regado de verduras. En la actualidad, con el cambio climático que no sólo se manifiesta a través del incremento de las temperaturas medias en respuesta al aumento de las concentraciones atmosféricas de los denominados gases de invernadero, sino que produce cambios en los ciclos hidrológicos en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Estos cambios hidrológicos podrían tener un efecto más determinante sobre las tasas de transmisión de las enfermedades transmitidas por mosquitos que el calentamiento global (Forgber *et al.*, 2006).

#### **5 RESISTENCIA A LA INMUNIDAD DEL HOSPEDERO**

La habilidad para evitar el ataque de los mecanismos efectores humorales, como la lisis del complemento, es de particular importancia en los protozoos extracelulares, mientras que los intracelulares pueden resistir ser muertos por las enzimas lisosomales y los metabolitos tóxicos. Esto lo logran mediante la remodelación de los compartimentos fagosomales en los que residen y por interferencia de las señales de alteraciones patológicas que llevan a la activación celular para la defensa. Además, hay una evidencia creciente que los protozoos modifican la presentación de antígenos y las funciones inmunoregulatoras de las células dendríticas, un proceso que facilita su evasión a la inmunidad innata (Sacks y Sher, 2003). Las células infectadas con protozoos mueren

durante la infección, mediante el mecanismo denominado apoptosis (muerte programada); esto es un importante efecto del mecanismo innato de respuesta del Hospedero. Además, cumple una función esencial en la regulación de la inmunidad y de la homeostasis tisular. No nos sorprende tampoco la adaptación del protozoo parásito a su huésped mediante la modulación de los mecanismos de apoptosis para facilitar la supervivencia del protozoo en el medio ambiente hostil. Esto se vio que lo realizan apicomplejos, kinetoplastidos y ameboides (Schaumburg *et al.*, 2006). Como los diferentes protozoos varían mucho en sus propiedades bioquímicas y estructurales, estimulan distintos patrones de respuesta inmune y han desarrollado mecanismos específicos para evadir la inmunidad del huésped. Así, la respuesta inmunitaria a los protozoos es distinta a las de las bacterias, hongos y virus. Los protozoos pueden ser fagocitados por los macrófagos, pero muchos son resistentes a la muerte en el fagolisosoma e incluso pueden replicarse dentro del macrófago. *Trypanosoma brucei* gambiense es el mejor ejemplo de los que inducen una respuesta humoral, debido a que son de vida extracelular. En las infecciones con *Leishmania* sp. Los mecanismos de defensa celular dependen de los linfocitos T-CD4 + y de los macrófagos activados como células efectoras que son reguladas por las citoquinas de la subpoblación Th1. *Plasmodium* sp. es un protozoo que activa una diversidad de mecanismos de defensa, que pueden ser celulares o humorales, dependiendo de los antígenos y de la ubicación del protozoo. Los diferentes protozoos han desarrollado vías de marcada efectividad para resistir la inmunidad específica:

- a) El secuestro anatómico es observado generalmente con *Plasmodium* sp. y con *Toxoplasma gondii*.
- b) Algunos pueden volverse resistentes a los mecanismos efectores de inmunidad, como *Trypanosoma*, *Leishmania* y *T. gondii*.
- c) algunos han logrado variar su superficie antigénica, como *Plasmodium* y *Trypanosoma*.
- d) Otros pierden su recubrimiento espontáneamente o luego de la unión con los anticuerpos específicos, como la *Entamoeba histolytica*.

e) Algunos alteran la respuesta inmune del huésped a través de una inmunosupresión generalizada e inespecífica (anormalidades en la producción de citokinas, deficiente activación de las células) como *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Entamoeba*. Los protozoos son capaces de resistir a los mecanismos inmunitarios y a los desinfectantes como el hipoclorito de sodio, que es capaz de matar todas las bacterias, hongos y virus. Son capaces de hacerse resistentes a los tratamientos, encareciendo la aplicación de las nuevas drogas y por lo tanto haciéndose inaccesibles a muchas comunidades afectadas endémicamente. Debe señalarse finalmente que, a pesar de su importancia, es escasa la atención prestada a esta problemática por los investigadores en todo el mundo.

## **6 IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA**

La transmisión ambiental de microorganismos patógenos constituye un medio altamente efectivo para la diseminación de enfermedades a una gran proporción de la población. La OMS estima que un 24% de las enfermedades que ocurren en el mundo están asociadas con factores ambientales, entre ellos el agua de calidad insegura y precarias condiciones higiénicas (WHO, 2007). Los cuerpos de aguas naturales que reciben desechos fecales de animales y humanos contienen numerosos microorganismos patógenos capaces de sobrevivir fuera de su hospedero. Estos microorganismos son transmitidos indirectamente a poblaciones susceptibles a través de las aguas de distribución inadecuadamente tratadas o a través de aguas recreacionales fuertemente impactadas con aguas residuales y desechos fecales de animales domésticos (Hurst y Murphy, 1996). La mayoría de los parásitos intestinales se transmiten por contaminación del ambiente y en este aspecto, el agua y los alimentos juegan un papel importante. Si las heces no se eliminan de manera apropiada, los quistes, ooquistes y huevos de los parásitos intestinales pueden quedar en el ambiente de las casas o contaminar fuentes de agua o cultivos regados con aguas residuales (Solarte *et al.*, 2006).

Los parásitos protozoarios *G. intestinalis*, *C. parvum* y *C. hominis* son patógenos intestinales excretados con las heces de humanos y animales infectados en concentraciones de hasta  $1 \times 10^9$  (ooquistes por gramo de heces (Morgan *et al.*, 2006). Los ooquistes son las formas infectantes y constituyen un estadio del ciclo de vida de

estos parásitos que los capacita para sobrevivir en el ambiente acuático y resistir los procesos de tratamiento de aguas de distribución y aguas de desecho doméstico (Betancourt y Rose, 2004). La ingestión no intencional de (oo)quistes infecciosos con las aguas y alimentos contaminados, así como la ingestión inadvertida de aguas contaminadas durante las actividades recreacionales, puede ocasionar problemas de salud pública. En países en vías de desarrollo, las enfermedades causadas por *Cryptosporidium* y *Giardia* forman parte del complejo grupo de enfermedades parasitarias que, junto con las enfermedades bacterianas y virales, son un factor que impide el avance potencial y el progreso social y económico de sus habitantes. Estos parásitos fueron incluidos recientemente en la Iniciativa de la OMS para las enfermedades desatendidas (Savioli *et al.*, 2006). La Iniciativa persigue abordar enfermedades parasitarias y otras enfermedades tropicales (entre ellas las helmintiasis intestinales, esquistosomosis, leishmaniasis, leptospirosis, etc.) de manera integrada a fin de garantizar el manejo efectivo (control y eliminación) de estas enfermedades.

Numerosos brotes epidémicos de enfermedades gastrointestinales han ocurrido por transmisión indirecta de los parásitos protozoarios *Giardia* y *Cryptosporidium* a través de aguas de distribución y cuerpos de aguas naturales y artificiales (lagos, ríos, playas y piscinas) empleados para recreación (Thompson *et al.*, 1993). Y se considera uno de los problemas de salud pública más prominentes en el mundo entero (Rose *et al.*, 2002). De igual manera, los protozoarios *C. cayetanensis* y *T. gondii* han estado asociados con brotes de enfermedades transmitidas a través del agua (Benenson *et al.*, 1982). A esta lista se suman los protozoarios intestinales *E. histolytica* y *B. coli*, los cuales son considerados patógenos de atención para la salud pública y con potencial de transmisión a través de las aguas, particularmente en países en vías de desarrollo (Díaz *et al.*, 2007). Estudios procedentes de países desarrollados indican que la mayoría de las aguas superficiales tienen niveles de contaminación parasitaria que deben ser considerados en los procesos de tratamiento y desinfección del agua de consumo humano. Se estima que el 60% de los casos de giardiasis ocurridos en EEUU han sido transmitidos por vía hídrica (Díaz *et al.*, 2007).

En Perú, las prevalencias de endoparásitos alcanzan valores muy elevados, tal como muestran los trabajos recientemente realizados. Las elevadas prevalencias, son reflejo de los bajos niveles de vida y de las condiciones deficientes de saneamiento ambiental.

## **7 ESTUDIOS PREVIOS REALIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE PROTOZOOS EN AGUAS COSTERAS**

Existen numerosos métodos de concentración y detección de protozoarios entéricos en aguas, que aplicados en conjunto con los métodos moleculares y cultivo celular permiten determinar de manera eficiente y sensible las especies y genotipos asociados con enfermedades en humanos. Conocer la importancia relativa de vías específicas de transmisión de protozoarios intestinales, incluyendo las fuentes potenciales de contaminación ambiental, constituyen aspectos fundamentales que permiten entender la epidemiología de las enfermedades parasitarias, de esta manera se pueden aplicar medidas correctivas que minimicen la prevalencia e incidencia de estas enfermedades en la población (Díaz *et al.*, 2007).

En Venezuela, existen estudios sobre protozoarios entéricos en ambientes acuáticos (Díaz *et al.*, 2007), sin embargo, son pocos y se requiere de más información en zonas costeras y sistemas de tratamiento de aguas para suministro.

Los métodos de detección de protozoarios intestinales en ambientes acuáticos, desarrollados en instituciones de diversos países, son evaluados constantemente con el fin de optimizar los diferentes procedimientos que permitan detectar de manera sensible y específica los protozoarios patógenos en aguas (Anónimo, 1999). Inicialmente, los métodos fueron diseñados y aprobados para el monitoreo de la prevalencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas de distribución y cuerpos de aguas naturales; sin embargo, han sido adaptados para el estudio y detección de *T. gondii* y *C. cayetanensis* (Dumetre y Darde, 2005).

El método estándar para el estudio de *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas incluye tres procedimientos básicos: Concentración, purificación y detección. Los procedimientos iniciales de concentración y purificación incluyen los siguientes pasos: 1) filtración de un volumen determinado de agua (10-100 L) con el propósito de capturar los (oo)quistes en una matriz de filtración 2) lavado del filtro con soluciones detergentes para desprender los (oo)quistes capturados en la matriz de filtración; 3) centrifugación a velocidad

moderada (1100-1500 g) a fin de reducir el volumen de muestra ( $\leq 5$  ml) y concentrar el material en suspensión junto con los (oo)quistes; 4) separación selectiva de (oo)quistes de los materiales inespecíficos en suspensión, utilizando partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos específicos para protozoarios (separación inmunomagnética) (Dumetre y Darde, 2005).

La detección de (oo)quistes se realiza mediante microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (ITFC), lo que permite incrementar la capacidad de visualizar los (oo)quistes y diferenciarlos de materiales inespecíficos y algas microscópicas (microalgas) presentes en ambientes acuáticos. La confirmación de (oo)quistes aislados de ambientes acuáticos se lleva a cabo mediante microscopía por contraste de fases o también mediante microscopía de interferencia diferencial. Adicionalmente se aplican fluorocromos específicos para ácidos nucleicos tales como el 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y el yoduro de propidio o PI por sus siglas en inglés (Propidium Iodide).

La microscopía por contraste de fases y de interferencia diferencial permite visualizar la morfología y estructuras internas de los (oo)quistes, tales como esporozoitos (*Cryptosporidium*) axonema y núcleos (*Giardia*). La tinción con los fluorocromos DAPI y PI permite no solo confirmar la prevalencia de ooquistes esporulados, sino que suministra además información acerca de la viabilidad de los ooquistes. Esto se debe a la habilidad que tienen los fluorocromos de penetrar de manera selectiva al interior de la estructura parasitaria (Campbell *et al.*, 1992).

El DAPI es un fluorocromo de tamaño pequeño que penetra fácilmente al interior de las células y tiñe selectivamente las regiones del ADN ricas en adenina y timina, por ello permite distinguir (ooquistes esporulados potencialmente viables. El PI es un fluorocromo de gran tamaño que penetra el interior de las células únicamente cuando la continuidad de las barreras físicas (pared y membrana celulares) han sido interrumpidas (Belosevic *et al.*, 1997), de ahí que los (oo)quistes que han incluido PI se consideran no viable.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Detectar protozoos y otros endoparásitos en muestras de agua y aire en 12 puntos de muestreo de la Bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.

### **Objetivo específico**

1. Identificar mediante tinciones diferenciales la prevalencia de *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., en los 12 puntos de muestreo de agua y aire de la Bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.
2. Determinar mediante técnicas de concentración parasitológicas (sedimentación – flotación) los protozoos y otros endoparásitos presentes en agua y aire de 12 puntos de muestreo en la Bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.
3. Comparar prevalencia y frecuencia de protozoos en agua y aire de la Bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.

## **HIPÓTESIS**

H1: Existe mayor presencia de protozoos parásitos en muestras de aguas en comparación con las de aire de la Bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.

Ho: No existe mayor presencia de protozoos parásitos en muestras de aguas en comparación con las de aire de la Bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.

# **CAPÍTULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. METODOLOGÍA

### 1.1 Área de estudio.

El estudio se realizó a lo largo de la zona costera de la Bahía de Panamá entre 9°00´ latitud norte y 79°30´ latitud oeste donde se establecieron las 12 estaciones de colecta, desde Costa del Este hasta Isla flamenco (**ver figura 17**).

### 1.2 Sitios de muestreo

Se realizaron tomas de muestras de agua y aire en 12 puntos a lo largo de la Bahía de Panamá, desde Costa del Este hasta Isla Flamenco (**ver figura 18**) en los meses de marzo, abril y mayo de la temporada seca del 2021. Las muestras de aguas se colectaron por duplicado haciendo un total de 24 muestras por mes de muestreo y con respecto a las de aire se tomó una sola muestra por sitio de muestreo con un total de 12 muestras por mes de muestreo. Los muestreos fueron programados de acuerdo con la tabla de mareas altas, ya que esto facilitó la recolección de las muestras de aguas y favoreció el muestreo de aire, por lo cual, se realizaron de forma simultánea. Detalle de los sitios de muestreo en la Bahía de Panamá:

**1. Costa del Este:** Ubicada en una urbanización residencial e industrial que lleva el mismo nombre, donde los niveles de basura en la zona costera son elevados, de oleaje tenue y sus aguas presentan una coloración oscura. Coordenadas: 9° 0'34.00"N 79°28'10.00"O.

**2. Panamá La Vieja:** Está ubicada entre la estatua Morelos y el Centro de Artesanías de Panamá Viejo, y presenta un oleaje fuerte, aguas oscuras y poca basura. Coordenadas: 9° 0'10.30"N 79°29'37.20"O.

**3. Coco del Mar:** Se localiza en un sector de multifamiliares conocido como Coco del Mar, el oleaje es tenue y el agua es oscura con poca basura. Coordenadas: 8°59'41.00"N 79°29'48.00"O

**4. Boca la Caja:** Se encuentra en el sector conocido con este mismo nombre y donde se localiza una pequeña comunidad de pescadores. Se caracteriza por presentar aguas oscuras, carecer de oleajes y basura. Coordenadas: 8°59'0.40"N 79°30'16.50"O.

**5. Club Unión:** Ubicada en el área de Paitilla, específicamente detrás del Club Unión en el lugar conocido como "La Rampa". Presenta un oleaje poco fuerte, aguas claras y libres de basura. Coordenadas: 8°58'30.00"N 79°30'41.00"O.

**6. Río Matasnillo:** Este punto está localizado en la Av. Balboa, en la desembocadura del río Matasnillo. Generalmente se perciben malos olores; además de presentar gran cantidad de basura y un oleaje poco fuerte. Coordenadas: 8°58'26.00"N 79°31'5.30"O.

**7. Hospital Santo Tomás:** Se ubica a un costado del Monumento a Vasco Núñez de Balboa y cercano al Hospital del Niño. Presenta poca basura, oleaje fuerte y aguas oscuras. Coordenadas: 8°58'4.00"N 79°31'52.00"O.

**8. Mercado del Marisco:** Se localiza en la parte posterior del Mercado del Marisco de la Ave. Balboa. La estación se caracteriza por poseer aguas oscuras, mucha basura y oleajes fuertes. Coordenadas: 8°57'35.4"N 79°32'10.3"O.

**9. Las Bóvedas:** La encontramos en el sector conocido como Casco Viejo en el corregimiento de San Felipe, exactamente a un costado de la Plaza de Francia. Sus aguas son oscuras, sin basura, y de poco oleaje. Coordenadas: 8°57'2.00"N 79°31'57.00"O.

**10. Muro de los Poetas:** Se encuentra en la Ave. de los Poetas, frente a la subestación de policía del Chorrillo. Sus aguas oscuras muchas veces utilizadas para recreación por moradores del área presentan oleajes algunas veces fuertes y de poco a nada de basura. Coordenadas: 8°57'2.00"N 79°31'57.00"O.

**11. Antigua ARI:** Está al inicio de la Calzada de Amador en la parte posterior a las oficinas de la Autoridad de la Región Interoceánica (ARI). Presenta aguas tranquilas y oscuras; con algo de vegetación y nada de basura. Coordenadas: 8°56'10.00"N 79°32'42.00"O.

**12. Isla Flamenco:** Esta estación se ubica dentro de la Calzada de Amador en la Isla llamada Perico, exactamente en la parte posterior de los restaurantes. Presenta poca basura, aguas oscuras y oleaje tenue. Coordenadas: 8°54'28.2"N 79°31'09.0"O.

### **1.3 Método en campo**

#### **1.3.1 Colecta de las muestras de aire**

Se colocó un sistema Impinger (AGI-30, ACE Glass) de 120 ml, que contenía 50 ml del tampón PBS (por sus siglas en inglés, Phosphate Saline Buffer) a pH 7.2 y peptona (1%), con un flujo del aire de 5 L/min durante 1 h. Pasado este tiempo, cada muestra de tampón de PBS de cada sitio de muestreo, fue recolectada en envases de urinálisis estériles y transportadas en cadena de frío a los Laboratorios de Microbiología de Aguas (LAMA) y de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA), de la Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado, Universidad de Panamá, donde fueron procesadas.

#### **1.3.2 Colecta de las Muestras de agua**

Las muestras de agua fueron tomadas en cada uno de los 12 puntos, con una distancia de 10 m de la orilla utilizando una vara de colecta con esta medida, conectándose 2 litros de agua colocándolas en botellas de plásticos. Posteriormente, en el laboratorio, las 24 muestras de agua por mes de muestreo se dejaron reposar para lograr una sedimentación por un tiempo no menor de 2 h y no mayor de 24 h, para su procesamiento, donde se utilizó la técnica sifoneo, para la reducción del volumen y posteriormente, la filtración de estas.

### **1.4 Método de laboratorio**

#### **1.4.1 Procesamiento de las muestras de aire**

Las muestras de tampón PBS de cada sitio de muestreo, fueron filtradas a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ . Los filtros se guardaron en tubos tipo Falcon de 50 ml y luego, se le añadió 15 ml de PBS para separar las partículas (suelo, arena, protozoos, etc.) adheridos a los filtros, y el sobrenadante se pasó a través de gasas y se transfirió a tubos estériles tipo Falcon de 15 ml, los cuales pasaron por un proceso de centrifugación a 3000 rpm/10 min, y luego, se descartó el sobrenadante y se obtuvo el sedimento (pellet) que fue dividido y preservado en glicerol al 40% y formalina al 7%, para los análisis que se realizaron.

## **1.4.2 Procesamiento de las muestras de agua.**

### **1.4.2.1 Técnica de Sifoneo**

A las 12 muestras de aguas ya sometidas al proceso de sedimentación durante 24 horas, se les redujo el contenido de agua por medio de la técnica de sifoneo, empleando para ello, una manguera de calibre delgado, por medio de la cual, se decantó el sobrenadante por el método de vaciado por sifón. Cada muestra de agua fue reducida a un mínimo entre 10 - 15 ml.

### **1.4.2.2 Técnica de Pre-Filtrado y Filtración**

Cada muestra de 2 L fue pre-filtrada a través de un sistema de filtración al vacío, empleando un embudo Buchner de 500 ml con papel filtro absorbente. Los filtros empleados se colectaron del sistema y se colocaron en un tubo tipo Falcon de 50 ml. Luego de este pre-filtrado, se realizó un filtrado por filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  que fueron recolectados en tubos tipo Falcon de 50 ml. Un total de 12 muestras de pre-filtrado y 12 muestras de filtrado, fueron procesadas de la misma manera y a cada tubo Falcon, se le añadió 20 ml de tampón PBS y se homogenizó cada muestra vigorosamente en un vortex durante 5 min, para liberar toda partícula adherida a los filtros y seguido, se pasaron a través de gasas, para recolectar el sobrenadante en tubos Falcon de 15 ml. Después, estas muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm/10 min y se descartó el sobrenadante, obteniendo un sedimento (pellet). Este sedimento fue dividido y preservado en glicerol al 40% y formalina al 7% para los análisis que se realizaron. Luego, se filtraron las muestras y los filtros se guardaron en tubos tipo Falcon de 50 ml, teniendo así, dos tubos por muestra con diferentes cantidades de filtros dependiendo de la carga del sedimento de la muestra. Después, a este pre-filtrado, se le realizó un segundo filtrado utilizando el sistema de embudos magnéticos anteriormente descrito en el proceso de las muestras de aire, con los mismos tipos de filtros. Estos filtros se colocaron en tubos Falcon de 50 ml. Quedando un total de 24 muestras a las que posteriormente se les añadió 20 ml de PBS para lavar los filtros. Este PBS, se transfirió a tubos tipo Falcon de 15 ml, filtrándose a través de gasas estériles. Seguido, se procedió a centrifugar a 3,000 rpm /10 min y luego, se descartó el sobrenadante, obteniéndose un pellet, que se procedió a resuspender con 200  $\mu\text{L}$  de formalina. Finalmente, se colocó

una gota de la muestra en un portaobjeto, con una gota de cada reactivo para su observación.

### **1.4.3 Técnicas de Concentración**

#### **1.4.3.1 Concentración por sedimentación: Técnica de Ritchie**

Las muestras procesadas se pasaron a tubos cónicos de 15 ml y luego, se centrifugaron a 3000 rpm /1 min, y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se le añadió 3 ml de formalina y se agitó con ayuda del vortex durante 1 min. Después, se le añadió 3 ml de acetato de etilo y se volvió a agitar utilizando el vortex durante 1 min, y se centrifugó a 1500 rpm/5 min, y posteriormente, se descartó el sobrenadante. Después, se formó una capa compuesta por sustancias grasas, la cual se removió con palillos y se decantó el sobrenadante. El sedimento fue sometido a técnicas de concentración por flotación.

#### **1.4.3.2 Concentración por Flotación: Técnica de Sheather**

Al sedimento se le añadió una solución azucarada sobresaturada hasta la mitad de cada tubo y se agitó con ayuda de un vortex durante 1 min, para homogeneizar la muestra. Luego, se le añadió esta solución azucarada sobresaturada hasta formar un menisco invertido que permitió que los huevos, ooquistes y quistes, flotaran y permanecieran en la superficie. Después sobre el menisco invertido, se colocó un cubreobjetos durante 5 a 8 min para que se lograran adherir las diferentes formas parasitarias. Pasado este proceso, se colocó cuidadosamente el cubreobjetos sobre una gota de Lugol, adicionada a un portaobjeto y se procedió a la revisión microscópica de las muestras.

### **1.4.4 Protocolo de Tinción**

#### **1.4.4.1 Tinción Ziehl Neelsen**

Se tomó una porción moderada de las muestras y se les hizo extensiones finas sobre los portaobjetos, dejándolo secar a temperatura ambiente (TA). Después, se fijó la muestra con metanol durante 5 min y se procedió a cubrir la preparación con el reactivo Fucsina (toda la muestra debe quedar cubierta), aplicándole calor durante 5 min (deberá haber emisión de vapor, pero no debe hervir). Luego, se enjuago con agua y se procedió a decolorar con alcohol-ácido durante 20 - 30 s o hasta que solo queden trazos del color

rojo. Por último, se cubrió la preparación con azul de metileno o verde malaquita durante 1 min y se enjuaga con agua, se dejó secar a TA y se visualizó al microscopio.

#### **1.4.4.2 Tinción Giemsa**

Se tomó una porción moderada de las muestras y se les hizo extensiones finas sobre los portaobjetos dejándolo secar a TA. Se cubrió la extensión con metanol y se esperó entre 4 - 5 min, y luego, se decantó para eliminar el metanol, se cubrió la extensión con solución de Giemsa diluida a 1/10 y se dejó actuar durante 25 min. Después, se lavó la extensión con agua destilada para eliminar los restos de colorantes y se dejó secar a TA en posición vertical. Por último, se procedió a visualizar al microscopio.

# **CAPÍTULO III**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## RESULTADOS

Las muestras tomadas dentro de las aguas superficiales de la Bahía de Panamá en los 12 sitios de muestreo dieron como resultado 72 muestras en total, siendo 36 muestras de agua y 36 muestras de aire. Al analizar las muestras de agua y de aire obtenidas de los 12 puntos de la Bahía de Panamá durante los meses de marzo, abril y mayo de la temporada seca de 2021, se pudo determinar la prevalencia de los protozoarios *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., los cuales eran de gran interés en este estudio y a su vez de otros endoparásitos.

En cuanto a la frecuencia parasitaria de los protozoarios que se tenía como objetivo en esta investigación, se ha comprobado que *Cyclospora* sp., es el que presentó mayor prevalencia con un 27% de todas las muestras analizadas, lo que indica que es uno de los parásitos que más prevalencia en la Bahía de Panamá, seguido por *Cryptosporidium* sp. con un 17% y, por último, con menor prevalencia se tiene a *Giardia* sp., con un 7% (**ver tabla 2**). En cuanto a otros protozoarios que se encontraron en menor cantidad están: *Chilomastix* sp., *Endolimax* sp., con un (1%) de prevalencia cada uno. En cuanto a los helmintos, el que presento mayor frecuencia fue *Ascaris lumbricoides* con un 14%, mientras que *Trichuris* sp., fue el que presento menor frecuencia con 1% (**ver tabla 2**).

Al analizar la prevalencia de las diversas formas parasitarias se identificaron un total de 17 géneros diferentes, en los cuales se encontraban diferentes formas infectivas tanto de protozoos como de helmintos, entre ellas se encontraron: *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Cystoisospora* sp., *Blastocystis* sp., *Entamoeba coli*, *Chilomastix* sp., *Entamoeba* sp., *B. coli*, *Endolimax* sp., esto en cuanto a protozoos. Referente a helmintos, se encontraron 5 géneros en los cuales se encuentran: *A. lumbricoides*, *Taenia* sp., *Trichuris* sp., *Uncinaria* sp., y *Toxocara* sp. (**ver tabla 3**).

Referente a la prevalencia parasitaria por sitios de muestreos en cuanto a los géneros de protozoarios de mayor interés *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., se puede decir que el lugar con mayor prevalencia de parásitos en la Bahía de Panamá fue Coco del mar y Boca la Caja con 20%, seguido por el Mercado del Marisco con un 15%. Mientras que, Panamá Viejo, Salida del Río Matasnillo y Las Bóvedas no se detectaron formas parasitarias (**ver tabla 4**). Mientras que para los resultados obtenidos de manera

general en la detección de todo parasito y helmintos en muestras de agua y aire los puntos con más prevalencia fueron: Costa del Este 17%, Cocco del mar 18% y Boca la Caja 17%, y para los puntos con menor prevalencia tenemos a: Panamá la Vieja 2%, Club Unión 4%, Salida del Rio Matasnillo 2%, La Bóvedas 2% y el Muro de los Poetas 3% **(Ver tabla 5)**.

Al realizar las pruebas de Q de Cochran, siendo un test para comprobar la igualdad de varias muestras relacionadas en una variable dicotómica y una gran aproximación de la muestra en particular y la prueba de Kruskal Wallis, que es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población, se demostró que, dentro de los resultados obtenidos, si existe evidencia suficiente, para indicar que las técnicas para los diagnósticos son igualmente efectivas dando como resultado una  $p=0.93$ .

En cuanto a la detección en muestras de aire de la Bahía de Panamá, se pudo identificar a *Cryptosporidium sp*, *Blastocystis sp*, *Chilomastix sp* y *Entamoeba coli*, en sitios como: Mercado del Marisco, Isla Flamenco y La antigua ARI, demostrando que el aire es un mecanismo de dispersión y agente contaminante de suma importancia, **(ver figura 5)**.

En la prevalencia parasitaria por técnicas, los resultados nos confirmaron que el método directo es el que presenta mayor sensibilidad al momento de la detección, presentando un 45% de muestras positivas, es decir, aquellas muestras donde se detectaron los parásitos de interés: *Giardia sp.*, *Cryptosporidium sp.* y *Cyclospora sp.* Mientras que, para el resto de las técnicas utilizadas, estos arrojaron que el método que siguió fue la tinción de Zielh Neelsen, presentando el 33% de muestras positivas, seguido por la tinción de Giemsa con el 20% y, por último, el método de Sheather con 2% **(ver figuras 6)**.

Se detectó que la mayor prevalencia de parásitos fue de las muestras de agua con un 87%, mientras que solo un 13% fue la prevalencia en las muestras de aire **(ver Figura 7)**. En cuanto a la frecuencia de los protozoarios de interés en muestras de agua y de aire, se obtuvo que *Cyclospora sp.* se encuentra en mayor número en las muestras de agua, representando el 24%, reportado mayormente en el mes de marzo en sitios como Boca la Caja, seguido por *Cryptosporidium sp.* con 17%, reportado mayormente en el mes de abril y, por último, se encuentra *Giardia sp.* con 7% reportado mayormente en el mes de marzo, mientras que en las muestras de aire solo se detectó *Cryptosporidium sp.*

con 7% reportando mayormente en el mes de abril en sitios como Isla Flamenco **(ver figura 8)**.

Se encontraron un total de 88 parásitos, de los cuales el 51% son muestras positivas, donde se detectaron los protozoarios de interés: *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., mientras que el 49% son muestras positivas para el resto de los protozoos y helmintos detectados **(ver figura 9)**.

En cuanto a la distribución parasitaria por meses de muestreo, el mes donde se obtuvo mayor porcentaje de parásitos detectados es el mes de abril con 43%, seguido del mes de marzo con 36% y, por último, el mes de mayo con 21%. En el mes de abril se detectaron el mayor porcentaje de los protozoarios de interés y en el mes de marzo fue donde se detectó mayor porcentaje del resto de nuestras muestras positivas para otros protozoarios y helmintos **(ver Figura 10)**.

El análisis clúster de similitud de Bray-Curtis, permitió comparar las comunidades entre sitios. La clasificación simplifica datos colocando los puntos similares en una misma clase o grupo, demostrando que las zonas de los extremos son similares, al igual que los sitios en las zonas céntricas. Al analizar los resultados obtenidos por medio de la prueba de Bray-Curtis, en cuanto a los 12 sitios de muestreo de la Bahía de Panamá, se obtuvo como resultados la similitud de 0.45 en cuanto a características cuantitativas de los puntos: Costa del este, Boca la Caja, etc. **(Figura 11)**. Para los análisis obtenidos en cuanto a los puntos de muestreo por parásitos de interés (Positivos de interés) detectados de la Bahía de Panamá, se obtuvo como resultados la similitud de 0.525 de la detección de los coccidios (*Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp.), en comparación con una no similitud de 0.375 en el diagnóstico de *Giardia* sp., detectado **(ver figura 12 y 13)**.

## DISCUSIÓN

Se confirmó la prevalencia de protozoarios y endoparásitos en muestras de agua y de aire provenientes de 12 sitios a lo largo de la Bahía de Panamá, desde Costa del este hasta la Calzada de Amador. Los muestreos fueron realizados durante la estación seca, en los meses de marzo, abril y mayo de 2021. Se identificaron un total de 17 géneros, de los cuales se encontraban diferentes tipos de parásitos tanto protozoarios como helmintos. Se reportaron entre ellos: *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Cystoisospora* sp., *Blastocystis* sp., *Entamoeba coli*, *Chilomastix* sp., *Entamoeba* sp., *Balantidium* sp., *Endolimax* sp., esto en cuanto a protozoos. En cuanto a los helmintos se encontraron: *Fasciola* sp., *Áscaris* sp., *Taenia* sp., *Trichuris* sp., *Uncinaria* sp. y *Toxocara* sp. La mayor cantidad de parásitos detectados procedían de las muestras de agua con un 87%, mientras que solo un 13% fueron encontrados en las muestras de aire. siendo de los meses de muestreo en temporada seca, abril el que mayor % de prevalencia parasitario reporto.

Según Guillén (2016), siendo sus meses de muestreo junio, julio y agosto de 2014, El mes en el que encontró mayor prevalencia de parásitos fue junio, mes de transición de la época seca a la lluviosa. En comparación con el trabajo realizado por Staff (2021), que se realizó en la temporada lluviosa, siendo octubre el mes con mayor abundancia.

También, ambos trabajos realizaron un estudio con muestras de aire, en las que Según Guillén (2016), reporta que todas resultaron negativas, no coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio, ya que con el trabajo de Staff (2021) se pudieron detectar hasta 2 tipos de protozoos en un solo sitio de muestreo, siendo sus resultados muy similares con los nuestros que reportaron protozoarios en muestras de aire en nuestro país.

La profundidad del agua es uno de los factores determinantes para los protozoarios dado que afecta su ubicación dentro de la misma. Las velocidades de sedimentación de los quistes y oocistos suspendidos libremente son demasiado bajas para causar una sedimentación significativa en aguas poco profundas con velocidades muy rápidas. Por lo tanto, una vez ingresan a las aguas superficiales por descargas de escorrentías serán

llevados por los corrientes adheridos a partículas orgánicas a lugares de aguas donde las corrientes sean más bajas y se puedan sedimentar (Medema *et al.*, 1998).

Los helmintos al igual que los protozoarios también se ven afectados por las velocidades de corriente del agua, ya que se distribuyen en donde no existan fuertes corrientes y pueda darse su sedimentación. La velocidad de sedimentación de los huevos está determinada por la movilidad del sedimento presente en la corriente de agua, sin embargo, la resuspensión aumentará la concentración de huevos suspendidos en el agua (Sengupta *et al.*, 2011).

Martínez Fernández (2002), en su publicación sobre el agua y la transmisión parasitaria, señala que la prevalencia de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* es motivo de preocupación de las autoridades sanitarias norteamericanas desde hace ya algunos años y que empieza a preocupar a las europeas a la vista de la última directiva de agua de consumo humano, y 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 para la criptosporidiasis, no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz.

Arza *et al.* (2002), realizaron un estudio donde resaltan que el origen (o uno de ellos) de la proliferación de *Cryptosporidium*, en el medio natural, se encuentra en la ineficacia de nuestros sistemas de tratamiento de aguas: tanto la depuración de aguas residuales como la potabilización de agua para consumo humano, lo que no suponen un obstáculo excesivo para la supervivencia de los ooquistes de este protozoario. Dentro de ellos, las estaciones depuradoras de aguas residuales se muestran particularmente vulnerables al paso de quistes por los procesos físicos y biológicos de las instalaciones convencionales. Estudios diversos realizados en tipos diferentes de plantas depuradoras revelan que el número de quistes en un agua depurada puede ir de unidades a miles de unidades por litro.

En este estudio, se obtuvo que *Cyclospora* sp., es el protozoario que presenta mayor prevalencia con 24%, seguido por *Cryptosporidium* sp. con 17% y, por último, con menor

prevalencia se tiene a *Giardia* sp con 7%. En otros trabajos realizado en Panamá por Guillén (2016) y Staff (2021), demuestran que los protozoos más frecuentes detectados en sus estudios fueron los coccidios (*Cyclospora* sp y *Cryptosporidium* sp) con mayor % de prevalencia, seguido con menor prevalencia a *Giardia* sp., demostrando similitud en cuanto a los resultados obtenidos en este estudio. En cuanto a los protozoarios que presentaron menor prevalencia están: *Chilomastix* sp., *Fasciola* sp y *Endolimax* sp., con 1% cada uno. En cuanto a los helmintos el que presento mayor frecuencia fue *Áscaris* sp, con un (14%), mientras que *Trichuris* sp., fue el que presento menor frecuencia (1%). En un estudio realizado por Cazorla *et al.* (2012), sobre perfiles clínicos y epidemiológicos de la infección por coccidios intestinales en Venezuela, han detectado prevalencias globales de entero-coccidiosis entre 26-28%; y de todos los taxa de entero-parásitos observados, destaca el predominio del cromista *Blastocystis* sp. Ellos presentan en su estudio la prevalencia global de coccidiosis intestinales de más del 50% y el predominio del coccidio *Cryptosporidium* sp. sobre *Blastocystis* sp., ambos se presentaron en elevada frecuencia en asociación con hasta cinco taxa de entero- parásitos, lo que difiere con este estudio porque el coccidio más prevalente fue *Cyclospora* sp. con 24%.

Para la detección de estos parásitos se utilizaron diferentes técnicas, como fueron el montaje directo, el método de Sheather, la tinción de Giemsa y la tinción de Zielh-Neelsen. En un estudio realizado por Cuellar (1997), sobre la prevalencia de infecciones intestinales causadas por Coccidios: *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, señala que la identificación de quistes, ooquistes o trofozoítos de protozoarios endoparásitos puede necesitar en circunstancias determinadas, coloraciones especiales. En su estudio, se tuvieron en cuenta coloraciones diferenciales tales como: Zielh- Neelsen modificada, Giemsa, y Safranina – azul de metileno, que en su mayoría se les ha evaluado su sensibilidad y especificidad, para el diagnóstico de otro coccidio como *Cyclospora* sp., como este presenta características similares al *Cryptosporidium* sp. en cuanto a forma y composición del ooquiste; las técnicas de tinción mencionadas se evaluaron en esta investigación, para el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., ya que son pocos los estudios que evalúen sensibilidad y especificidad de estas tinciones para este microorganismo. Según los resultados de la sensibilidad y especificidad de las tinciones comparadas, en este estudio, en el caso de

*Cryptosporidium* sp., las técnicas no presentan diferencias significativas, lo que apunta a que el uso de las tres tinciones puede resultar útiles como herramientas diagnósticas, siendo la tinción de Zielh- Neelsen modificada, la más sensible y específica, a diferencia de lo encontrado por nosotros en este estudio, que el montaje directo fue el más sensible.

Se ha reconocido que la lluvia es un factor que contribuye a diluir elementos en un ambiente acuático dado. En este sentido, Arcay y Buzual (1993), resaltan la disminución de parásitos en muestras estudiadas provenientes de varios ríos de Venezuela, por efecto de las lluvias.

Según la tesis de Alice Staff (2021), quien realizó un estudio muy parecido a este, con la diferencia de que su estudio fue realizado en la estación lluviosa, durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2019, en los mismo 12 puntos de muestreo ubicados a lo largo de la Bahía de Panamá, y sus resultados señalan que el sitio de Panamá La Vieja, fue el que presentó mayor prevalencia de parásitos, en cambio en este estudio el sitio de mayor prevalencia fue Boca la Caja, y el sitio de Panamá La Vieja, no presentó prevalencia parasitaria, lo que refleja que existe una diferencia entre ambas estaciones, seca y lluviosa. Al igual que en el estudio de Staff, se logró detectar la prevalencia de protozoarios y endoparásitos en muestras de agua y de aire provenientes de la Bahía de Panamá. A diferencia de su trabajo identificando 15 géneros, en cambio en nuestro trabajo se logró identificar 17 géneros de parásitos y ella obtuvo como protozoario prevalente a *Giardia* sp, mientras que en este estudio el más prevalente fue *Cyclospora* sp.

En otro trabajo tesista realizado por Guillén (2016), quien también realizó un estudio muy similar a este y en los mismos 12 puntos de la Bahía de Panamá, pero durante los meses de junio, julio y agosto de 2014, según sus resultados, el punto de Río Matasnillo fue el que mostró la mayor diversidad parasitaria, en cambio en este estudio se encontró que Boca la Caja fue el que presentó la mayor prevalencia de endoparásito, siendo el río Matasnillo reportado con apenas el 2.27% de prevalencia parasitaria. Demostrando que los resultados de este estudio presentan algunas similitudes y diferencias en los siguientes aspectos: se encontró tanto protozoos como helmintos, se logró detectar presencia de parásitos en los 12 sitios de muestreo y los coccidios fueron los protozoos

con mayor prevalencia. No son similares en el tipo de endoparásito encontrados, ya que en las muestras de este estudio se reportaron 17 géneros mientras que el de Guillén (2016) fueron 11, y en sus resultados se obtuvo reportes de formas larvarias, mientras que este estudio no se reportó.

La OMS (2010), afirma que aproximadamente dos billones de personas en el mundo están infectados con parásitos intestinales y la gran mayoría de estas personas viven en países en vías de desarrollo. Latinoamérica, es una de las regiones donde el parasitismo es particularmente preocupante. La prevalencia de parásitos intestinales en la región se ha calculado en 45%.

Si bien la mortalidad por parásitos intestinales es baja, la morbilidad por su parte es alta y está dada por manifestaciones clínicas como: colitis, prolapso rectal, perforación y obstrucción intestinal, malabsorción intestinal, desnutrición y anemia ferropénica. Además, el parasitismo se ha relacionado, posiblemente por sus efectos en el estado nutricional de los niños, con alteraciones en el proceso del neurodesarrollo infantil, incluyendo alteración de las capacidades cognitivas y retardo del crecimiento OMS (2010)

Un estudio realizado por Walter Betancourt *et al.* (2008) en Caracas, en el cual trataron protozoarios entéricos en ambientes acuáticos, mediante métodos de concentración y detección, arrojó que la aplicación de métodos de detección de protozoarios patógenos en aguas ha sido fundamental en el esclarecimiento de aspectos que son importantes para entender la transmisión de protozoosis intestinales a través de ambientes acuáticos. Los nuevos sistemas de concentración (filtración y purificación) permiten recuperar selectivamente los (oo)quistes facilitando de esta manera el método subsecuente de detección. No se incluye en esta revisión las técnicas moleculares y cultivo celular, las cuales han permitido identificar modos de transmisión y fuentes de contaminación de los parásitos protozoarios intestinales *Cryptosporidium* y *Giardia* que constituyen hoy en día junto con otros protozoarios emergentes como *Cyclospora* y *Toxoplasma*, un problema de salud pública importante en el mundo entero.

En el Estado Aragua, Venezuela, se realizaron estudios en pozos profundos de cuatro municipios, donde se observó la prevalencia de protozoarios en el 90% de las muestras positivas, muy parecido a la prevalencia obtenida en las muestras de aguas de este estudio, que fue de 87%. Las especies más frecuentes corresponden a *Blastocystis* sp. y *Endolimax nana*, y solo en el Municipio Francisco Linares Alcántara, se observaron huevos de helmintos, a diferencia de lo observado en este estudio que el protozoario más prevalente fue *Cyclospora* sp. con 54%. Por otra parte, este estudio revela el problema de salud pública que constituyen las parasitosis intestinales en la comunidad indígena estudiada, en la que coexiste la falta de saneamiento y de abastecimiento de agua potable (Gallego *et al.*, 2014).

Finalmente, a pesar del paso de los años, por lo general acompañado por el avance tecnológico, los parásitos en las aguas han sido y siguen siendo un problema de contaminación biológica ambiental que influyen en la salud de la población, en el cual los sistemas sanitarios de cada comunidad deben prestar atención. Este estudio, permite conocer el estado actual de la Bahía de Panamá, desde Costa del este hasta la Calzada de Amador comparado con el trabajo de Guillen (2016), después de 7 años de este estudio, en cuanto a los grados de contaminación que se presentaron, conocer la prevalencia parasitaria por cada sitio muestreado en la Bahía y comparar con estudios realizados previamente, si se ha logrado disminuir los grados de contaminación. Reportamos que los grados de contaminación no han cambiado y se mantienen similares a los reportados hace 7 años.

# **CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

1. Se determinó la prevalencia de protozoos en 9 de los 12 sitios de muestreo a lo largo de la Bahía de Panamá (75%) y también, se reportó algunas especies de comensales y de helmintos intestinales.
2. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que un 51% de las formas parasitarias identificadas son protozoos de interés en salud pública (*Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp.), y el 49% los resultados detectados fueron para otros protozoarios y Helmintos.
3. Se logró detectar e identificar (17 géneros) de endoparásitos en muestras de agua, de los cuales dos reportes (*Blastocystis* sp en Boca la Caja, *Endolimax* sp en Isla Flamenco) y Nuevamente reportados (*Cryptosporidium* sp en Isla Flamenco, Mercado del Marisco, La antigua ARI y *Entamoeba coli* en Isla Flamenco), son identificados en muestras de aire provenientes de los 12 sitios de muestreo en la Bahía de Panamá en la estación seca de 2021.
4. Las muestras de agua poseen una mayor prevalencia de agentes parasitarios con un 87% en relación con las muestras de aire con una prevalencia de 13%.
5. Se reportó presencia de *Giardia* sp., *Cyclospora* sp. y *Cryptosporidium* sp. en muestras de agua y solo *Cryptosporidium* en sitios como (Mercado del Marisco, Isla Flamenco y La antigua ARI), en muestras de aire de la Bahía de Panamá.
6. El mayor número de reportes de protozoos fue de Coccidios con un 44%, siendo *Cyclospora* sp. en más prevalente con 27% y *Cryptosporidium* sp 17%, mientras que *Giardia* sp. solo representó un 7%.
7. De las técnicas y métodos utilizados la mejor para el diagnóstico de estos resultados fue el de Montaje Directo con 45%, seguido de la tinción Ziehl-Neelsen con 33%, la tinción de Giemsa con 20% y el método de concentración de Sheather solo con 2%.
8. Se determina que el mes de abril fue el mes con mayor prevalencia de estadios parasitarios 43% y qué de los 12 sitios de muestreo, los de mayor prevalencia parasitaria fueron Costa del Este 17.4%, Coco del Mar 18.18%y Boca la Caja 17.4%.

9. Las épocas en las que se realizaron los muestreos son de gran importancia, ya que, al comparar estos resultados, muestran menor prevalencia parasitaria que lo reportado en la estación lluviosa (Datos no mostrados).

## RECOMENDACIONES

1. Realizar una detección molecular y utilizar técnicas inmunológicas como la Inmunofluorescencia para determinar la viabilidad de los quistes y ooquistes de protozoos reportados.
2. Utilizar un mayor volumen de muestra a la hora de realizar los muestreos tanto para agua como para aire, ya que esto permitirá obtener mejores resultados.
3. Realizar divulgación científica para promover nuevos proyectos relacionados al saneamiento de la Bahía de Panamá, en donde los resultados de este estudio puedan ser comparados y poder demostrar si el grado de contaminación es aún elevado o a disminuido, y que las empresas con intereses afines puedan mejorar la calidad de servicios brindado a la población.
4. Es importante educar a la población sobre los riesgos que representan los niveles de contaminación de la Bahía de Panamá y a su vez, promover programas que contribuyan al desarrollo de una conciencia ciudadana y amor a nuestro ambiente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Pumarola. (1992). Microbiología y parasitología médica (segunda ed.). Madrid: ELSEVIER ESPAÑA.
- Alejandro Cruz-Reyes, B. C.-C. (2001). Glosario de términos de parasitología y ciencias afines. México.: Plaza y Valdés, S. A. de C. V.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., y Svård, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. Nature Review Microbiological. 8(6):413-422.
- Anónimo. (2012). Giardiasis. The center for food security and Public Health. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>
- Arcay, L.; Bruzual, E. (1993). *Cryptosporidium* en Ríos de Venezuela, encuesta epidemiológica de una población Humana y fauna en convivencia. Parasitol.17:11-18.
- Arosemena V.; Castillo C.; Guerra G. (2013). Tesis de licenciatura en Biología con orientación en microbiología y parasitología, Universidad de Panamá. En Detección de parásitos en los moradores del Río Chagres Chagres y sus fuentes de contaminación ambiental. Pp. 123,125. Panamá.
- Arza I, Méndez X, Valero F, Jofre J, Lucena F. (2002). Bacteriófagos como microorganismos modelo en los procesos de tratamiento de aguas potables. Tecnología del Agua. 223:30-7
- Belosevic M, Guy RA, Taghi-Kilani R, Neumann NF, Gyürék LL, Liyanage LRJ, Millard PJ, Finch GR. (1997). Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. Int J Parasitol 27:787-798.
- Betancourt WQ, Rose JB. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet. Parasitol. 126: 219-234.
- Borrego JJ, Mariño FJ. (1995). Estudio epidemiológico de zonas de baño de la provincia de Málaga. Sevilla: Junta de Andalucía.
- Botero D. y Restrepo M. (2003). Parasitosis humanas (4<sup>o</sup> ed). Fondo Editorial CI y D. Medellín, Colombia.

- Cabezas C. (2018). Enfermedades infecciosas relacionadas con el agua en el Perú. Simposio: agua, saneamiento y salud/ Rev Perú Med Exp Salud Publica. 35(2):309-16.
- Cairns, J.; Ruthven, J. A. 1972. A test of the cosmopolitan distribution of fresh-water protozoans. *Hydrobiologia*. 39: 405-427.
- Cazorla D, Acosta M, Acosta M, Morales P. (2012). Estudio clínico-epidemiológico de coccidiosis intestinales en una población rural de región semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Invest. Clín.* 53(3):173-181.
- Cuellar N. Tesis prevalencia de infecciones intestinales causadas por Coccidios: *Cryptosporidium sp, Cyclospora cayetanensis e isospora belli.* (1997). Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de ciencias Químicas y farmacia. Guatemala.
- D. Botero y M. Restrepo. (1998). Parasitosis humana (tercera ed.). Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- De Estrada M.; Casanova R.; Velarde C. (2003). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE. Lima, Perú: artes y diseños Laser.
- Díaz I, Botero L, Ledesma F, Molero de Bracho N, Cotech M, Jaouhari R, Quintero-Betancourt W. (2000). Prevalencia de enteroparásitos en individuos que acuden a una Unidad Asistencial en el Estado Zulia. *Kasmera*. 10:22-34.
- Dr. Núñez F., MSc. Hernández S., Dra. Ayllón L., Dra. Alonso M. (2013). Hallazgos epidemiológicos en infecciones parasitarias intestinales de un grupo de niños ingresados por diarreas. *Rev cubana Med Trop* vol.65 no.1 Ciudad de la Habana.
- Dra. Heredia L., MSc. Sánchez Y. (2014). Importancia de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua, según su uso. *Cubana Hig Epidemiol* vol.52 no.2.
- E. G. Rodríguez. (2013). Parasitología Médica (primera ed.). México: Manual Moderno S.A.
- Enlace Hispanoamerica de la Salud. (2012). Enlace Hispanoamerica de la Salud. Recuperado el 5 de abril de 2020, de <http://www.telemicroscopia.ehas.org/assets/diagnostico-parasitos-intestinales.pdf>
- Farrás., J. G. (1988). NTP 138: Pérdida de carga de los soportes de retención. Barcelona.: CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA TÉCNICA.

- Flanagan, P. A. (1992). *Giardia* diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiology and Infection*, 109(1):1.
- Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. (2019). Marco mundial para el agua, el saneamiento y la higiene en las zonas urbanas, UNICEF, Nueva York.
- Forgber, M.; Basu, R.; Roychoudhury, K.; Theinert, S; Roy, S. (2006). Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by Proteome Serology.
- Gállego Berenger, J. (2006). manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona: publicaciones y ediciones de la universidad de barcelona.
- Gallego, J. M.; Heredia, H. L.; Salazar, J. J.; Hernández, T. M.; Naranjo, M. M. & Suárez, B- L. (2014). Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua, Venezuela. *Rev. Cub. Med. Trop.* 66(2), 164-173.
- Gardner, T. B.; Hill, D. R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews.* 14(1):114-128.
- Guillén, M., & Sandoval Martínez, N. R. (2016). Detección de endoparásitos en agua y aire de 12 puntos de la Bahía de Panamá.
- Goebel EF y Braendler U. (1982). Ultrastructure of Microgametogenesis, Microgametes and ametogamy of *Cryptosporidium* sp in the small intestine of Mice. *Protistologica* T. XVIII Fasc. 3:331-4.
- González K., Rivas R. y Sandoval N. (2018). AGUAS, SUELOS Y HORTALIZAS COMO FUENTE POTENCIAL DE ENTEROPARÁSITOS EN NIÑOS DE LA ESCUELA MAJARA, CAPIRA. *Tecnociencia*, 5-26.
- González de la Rosa, J.B., Barbadillo Izquierdo, F., Merino Arribas, J.M. y Sánchez, J. (1999). Aparato Digestivo. Parasitosis intestinales. Protocolo diagnóstico-terapéutico. *Bol Pediatr.* 39:106-111.
- Gutiérrez, J. M., Aldasoro, E., Requena, A., Comin, A. M., Pinazo, M. J., Bardají, A., y Gascon, J. (2013). Refractory giardiasis in Spanish travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease.* 11(2):126-129.
- Heckadon., S. (2013). El saneamiento de la bahía, en la recta final. (E. M., Entrevistador).

- Henriksen S y Pohlenz J. (1981). Staining of *Cryptosporidium* by modified Ziehl-Neelsen technique. Act Vet Scand. 22:594-96.
- Katherine L. González, R. E. (2018). Aguas, suelos y hortalizas como fuente potencial de enteroparasitos en niños de la escuela majara, capira. Tecnociencia. 20(1):5-26.
- Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. A., y Gasser, R. B. (2014). Giardia/giardiasis—A perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnology Advances. 32(2):280-289.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Scheckenberger P, Winn W, eds. (1999). Diagnóstico Microbiológico. 5a. ed. México: Ed. Médica Panamericana;
- Leder K, Weller PF. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of giardiasis. A: UpToDate, Basow, DS, ed. UpToDate, Waltham, MA. (2014). [data de la consulta: 22-02-2015] Disponible: <http://www.uptodate.com>
- M., González; S., Rojas; T., y Rubalcaba. (2003). Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. Cuba, 1-8.
- Magaro H. (s.f.). Técnicas de diagnóstico parasitológico. Argentina.
- Martínez Fernández A. (2002). Agua y transmisión parasitaria. La Salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea. Madrid: Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Pp. 183-227.
- Martínez S., Rubio Margarita y Sarabia G. (2017). Biología molecular de protozoarios parásitos. México, Revista Ciencia. 68(1):10-13.
- Medema, G. J.; Schets, F. M.; Teunis, P. F. M.; & Havelaar, A. H. (1998). Sedimentation of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water. Appl. and Environ. Microbiol. 64(11):4460-4466.
- Núñez, F.A. (2004). Estudio de factores asociados con la reinfección por *Giardia lamblia* en niños de círculos infantiles. (Tesis de Doctorado). Departamento de Parasitología, Subdirección de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Cuba.
- OMS: Análisis y Evaluación Mundiales del Saneamiento y el Agua Potable (GLAAS) 2018-2019. (s. f.). OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.
- OMS UNICEF (2005). El Agua Fuente de Vida 2005-2015. [Documento en línea]. Disponible: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/waterforlife.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/waterforlife.pdf).




- OMS, (2002): Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). En: Guías para la calidad del agua potable, 2ª ed. Apéndice: Microbiological agents in drinking-water. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud, págs. 70–118.)
- Organización Mundial de la Salud. 2007. Salud de los trabajadores: plan de acción mundial. 60° Asamblea Mundial de la Salud. Disponible en: [http://www.who.int/occupational\\_health/WHO\\_health\\_assembly\\_sp\\_web.pdf](http://www.who.int/occupational_health/WHO_health_assembly_sp_web.pdf)
- Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 218-34.
- Pérez G., Rosales M., Valdez R., Vargas F. y Córdova O. (2008). Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Púb. 25: 144-148.
- Rendtorff, R. C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. American Journal of Epidemiology, 59(2), 209-222.
- Rina Girard de Kaminsky. (2014). Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico. En Manual de Parasitología (pág. 41). Tegucigalpa.
- Rodríguez T. (2013). Transporte de muestras. Montevideo.
- Rojas A. (13 de diciembre de 2017). conogasi/ método: disolución amortiguadora de fosfato (PBS). Recuperado el 3 de abril de 2020, de <http://conogasi.org/articulos/metodo-disolucion-amortiguadora-de-fosfatos-pbs/>
- Ronald Fayer. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Veterinary Parasitology 2004; 126:37-56.
- Sacks, D.; Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nature Immunology, 3: 1041-1047.
- Savioli, L., Smith, H., y Thompson, A. (2006). *Giardia and Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. Trends in parasitology, 22(5), 203-208.
- Sengupta, M. E.; Thamsborg, S. M.; Andersen, T. J.; Olsen, A. & Dalsgaard, A. Sedimentation of helminth eggs in water. Water Res. 2011; 45(15), 4651-4660.
- Schaumburg, F.; Hippe, D.; Vutova, P.; K. Lüder, C. G. 2006. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. Parasitology, 132: S69-S85.

- Slifko, T. R., Smith, H. V., y Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International journal for parasitology*, 30(12), 1379-1393.
- Solarte Y, Peña M, Madera C. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colomb Med*. 2006; 37(1): 74-82.: 534-557.
- Souza, E.; Silva, M.; Malafronte, R.; Torres, P.; Cardoso, M. y Ferreira, M. Prevalence, and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cad Saude Pública*. 2007; 23(2): 427-34.
- Thompson RC, Reynoldson AJ, Mendis AH (1993) Giardia and giardiasis. *Adv. Parasitol.* 32: 71- 160.
- Valdés, a. v. s. (2019). Detección de protozoos en el agua y aire provenientes de la Bahía de Panamá en época lluviosa de 2019". Universidad de Panamá.
- Vázquez J. (2012). Folleto de protozoología y técnicas parasitológicas. *MediSur*, 10(2).
- Vela E y Vásquez R. Elisa en *Cryptosporidium*. *Microbiología e Infectología* 1995;2(1):22-4.
- Weitzel T, Neira P, Mehlhorn H. Ciclosporiosis. Apt W, editor. *Parasitología Humana*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, 2013, pág. 175-8.
- World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Ximena N. Alvarez S. (2019). Práctica 6 - Fundamento del método de Ritchie. Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara.

# **ANEXOS**

## TABLAS

**Tabla 1.** Características morfológicas de *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp. (fuente: Parasitosis Humanas- Botero, Restrepo (5ª edición).

Parásito	Estadio Diagnóstico	Características del estadio
<p style="text-align: center;"><b><i>Giardia</i> sp.</b> (Flagelado)</p>		<p>Tamaño: 8-12 <math>\mu</math>m.</p> <p>Morfología: Ovalada.</p> <p>Posee 2-4 núcleos en su forma madura.</p> <p>Presencia de pared quística birrefringente.</p> <p>Presencia de axonema.</p>
<p style="text-align: center;"><b><i>Cryptosporidium</i> spp.</b> (Coccidio)</p>		<p>Estadio: Ooquiste</p> <p>Tamaño: 4-6 <math>\mu</math>m.</p> <p>Morfología: Esférica.</p> <p>Cuatro paredes exteriores lisas.</p> <p>Presencia de 4 esporozoitos en el ooquiste maduro.</p>
<p style="text-align: center;"><b><i>Cyclospora</i> spp.</b> (Coccidio)</p>		<p>Estadio: Ooquiste esporulado</p> <p>Tamaño: 8-10 <math>\mu</math>m.</p> <p>Morfología: Esférica.</p> <p>Contiene 2 esporoquistes 2 esporozoitos c/u.</p>

**Tabla 2.** Detección de parásitos intestinales en agua y aire de la Bahía de Panamá en la estación seca del año 2021.

N°	Parásitos	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Absoluta acumulada	Frecuencia Relativa	Frecuencia Acumulada
				%	
1	<i>Giardia</i> sp.	6	6	7	6.82
2	<i>Cryptosporidium</i> sp.	15	21	17	23.86
3	<i>Cyclospora</i> sp.	24	45	27	51.14
4	<i>Entamoeba</i> sp.	3	48	3	54.55
5	<i>Cystoisospora</i> sp.	2	50	2	56.82
6	<i>Blastocystis</i> sp.	2	52	2	59.09
7	<i>Entamoeba coli</i>	5	57	6	63.64
8	<i>Chilomastix</i> sp.	1	58	1	64.77
9	<i>Balantidium</i> sp.	5	63	6	71.59
10	<i>Paramecium</i> sp.	1	64	1	72.73
11	<i>Fasciola</i> sp.	1	65	1	73.86
12	<i>Endolimax</i> sp	1	66	1	75.00
13	<i>Ascaris lumbricoides</i>	12	78	14	88.64
14	<i>Taenia</i> sp.	5	83	6	94.32
15	<i>Trichuris</i> sp.	1	84	1	95.45
16	<i>Uncinaria</i>	2	86	2	97.73
17	<i>Toxocara</i> sp.	2	88	2	100
		<b>88</b>		<b>100</b>	

**Tabla 3.** Clasificación de parásitos intestinales de interés (Positivos) y el resto de la detección (positivos para otros protozoo y helmintos), en agua y aire de la bahía de Panamá en la estación seca del año 2021.

N°	Parásitos	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Absoluta acumulada	Frecuencia Relativa	Clasificación
				%	
1	<i>Giardia</i> sp.	6	6	7	(Positivos de interés)
2	<i>Cryptosporidium</i> sp.	15	21	17	
3	<i>Cyclospora</i> sp.	24	45	27	
4	<i>Entamoeba</i> sp.	3	48	3	
5	<i>Cystoisospora</i> sp.	2	50	2	
6	<i>Blastocystis</i> sp.	2	52	2	
7	<i>Entamoeba coli</i> .	5	57	6	
8	<i>Chilomastix</i> sp.	1	58	1	(otros positivos)
9	<i>Balantidium</i> sp.	5	63	6	protozoos
10	<i>Paramecium</i> sp.	1	64	1	
11	<i>Fasciola</i> sp.	1	65	1	
12	<i>Endolimax</i> sp.	1	66	1	
13	<i>Áscaris lumbricoides</i> .	12	78	14	(otros positivos)
14	<i>Taenia</i> sp.	5	83	6	Helmintos
15	<i>Trichuris</i> sp.	1	84	1	
16	<i>Uncinaria</i> sp.	2	86	2	
17	<i>Toxocara</i> sp.	2	88	2	
		<b>88</b>		<b>100</b>	

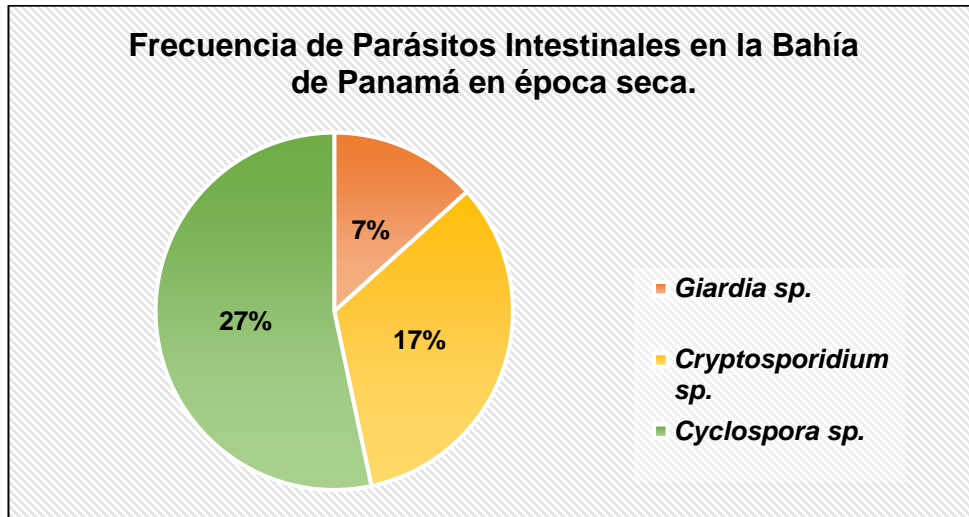
**Tabla 4.** Detección de los parásitos positivos de interés (*Giardia* sp., *Cyclospora* sp. y *Cryptosporidium* sp.) en 12 puntos de la bahía de Panamá en procesos de agua y aire en la estación seca del año 2021.

Sitios de muestreo	Suma de Positivos	%
Costa del Este	4	8.9
Panamá La Vieja	<b>0</b>	<b>0.0</b>
Coco del Mar	9	20.0
Boca la Caja	9	20.0
Club Unión	3	6.7
Salida del Rio Matasnillo	<b>0</b>	<b>0.0</b>
Hospital Santo Tomás	3	6.7
Mercado del Marisco	7	15.6
Las Bóvedas	<b>0</b>	<b>0.0</b>
Muro de los Poetas	2	4.4
Antigua ARI	4	8.9
Isla Flamenco	4	8.9
<b>Suma</b>	<b>45</b>	<b>100.0</b>

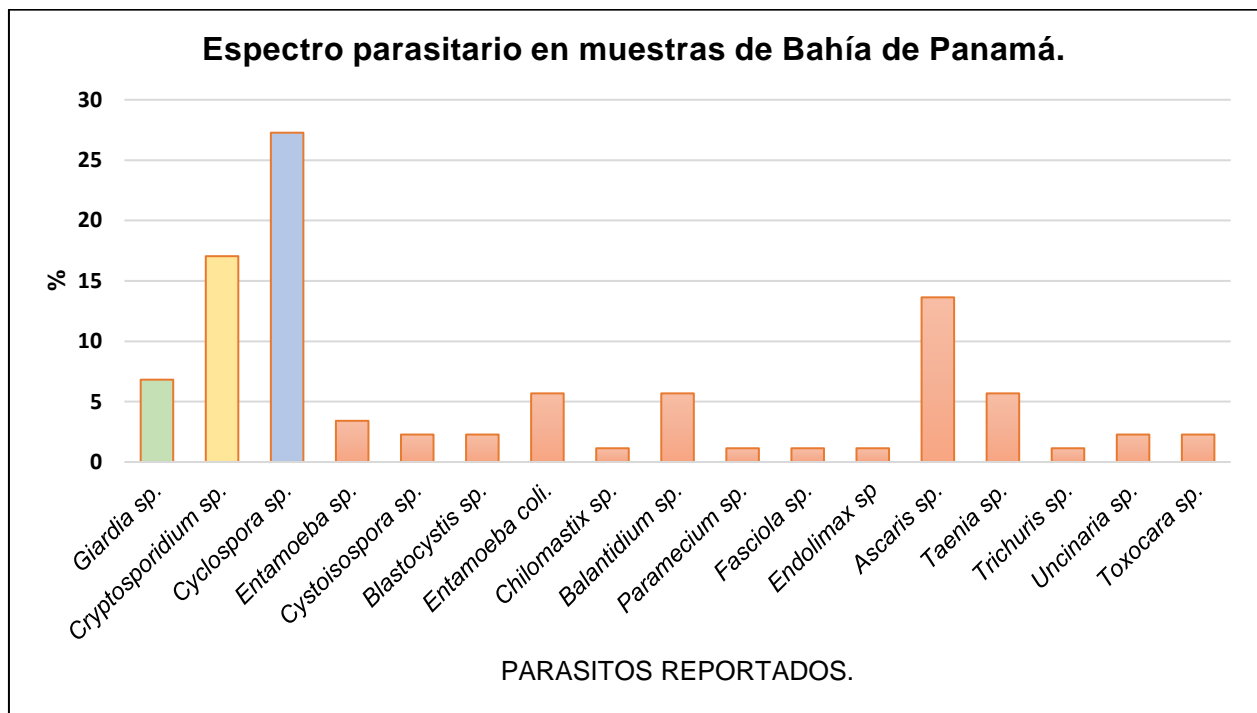
**Tabla 5.** Detección de parásitos intestinales en 12 puntos de la bahía de Panamá en procesos de agua y aire en la estación seca del año 2021.

Sitios de muestreo	N°	%
Costa del Este	15	17.04
Panamá La Vieja	2	2.27
Coco del Mar	16	18.18
Boca la Caja	15	17.04
Club Unión	4	4.54
Salida del Rio Matasnillo	2	2.27
Hospital Santo Tomás	7	7.95
Mercado del Marisco	7	7.95
Las Bóvedas	2	2.27
Muro de los Poetas	3	3.41
Antigua ARI	6	6.82
Isla Flamenco	9	10.23
<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>100%</b>

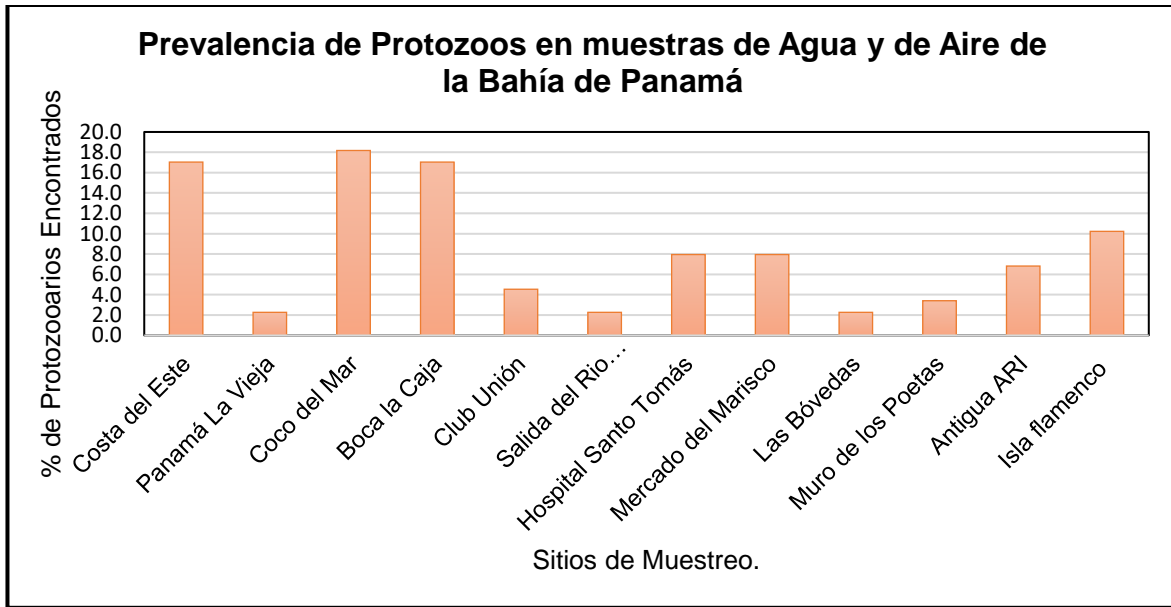
## FIGURAS



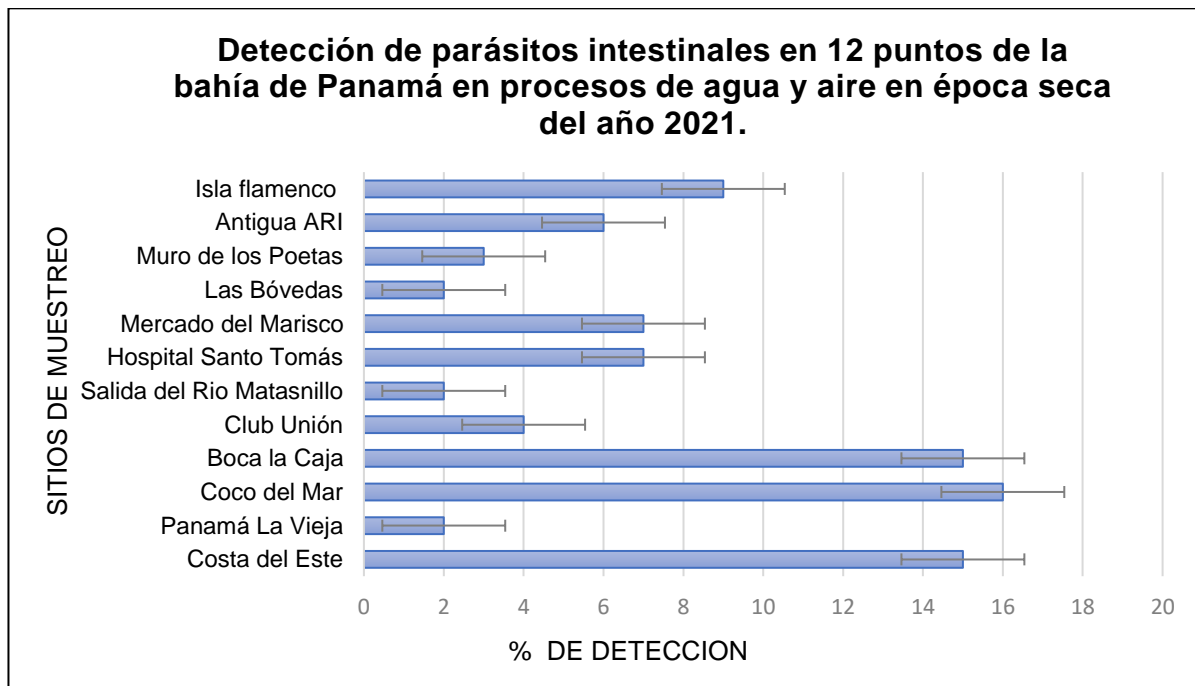
**Figura 1.** Comparación porcentual de parásitos intestinales de mayor interés (positivos), observados en muestras de agua y aire en la estación seca de la Bahía de Panamá del año 2021.



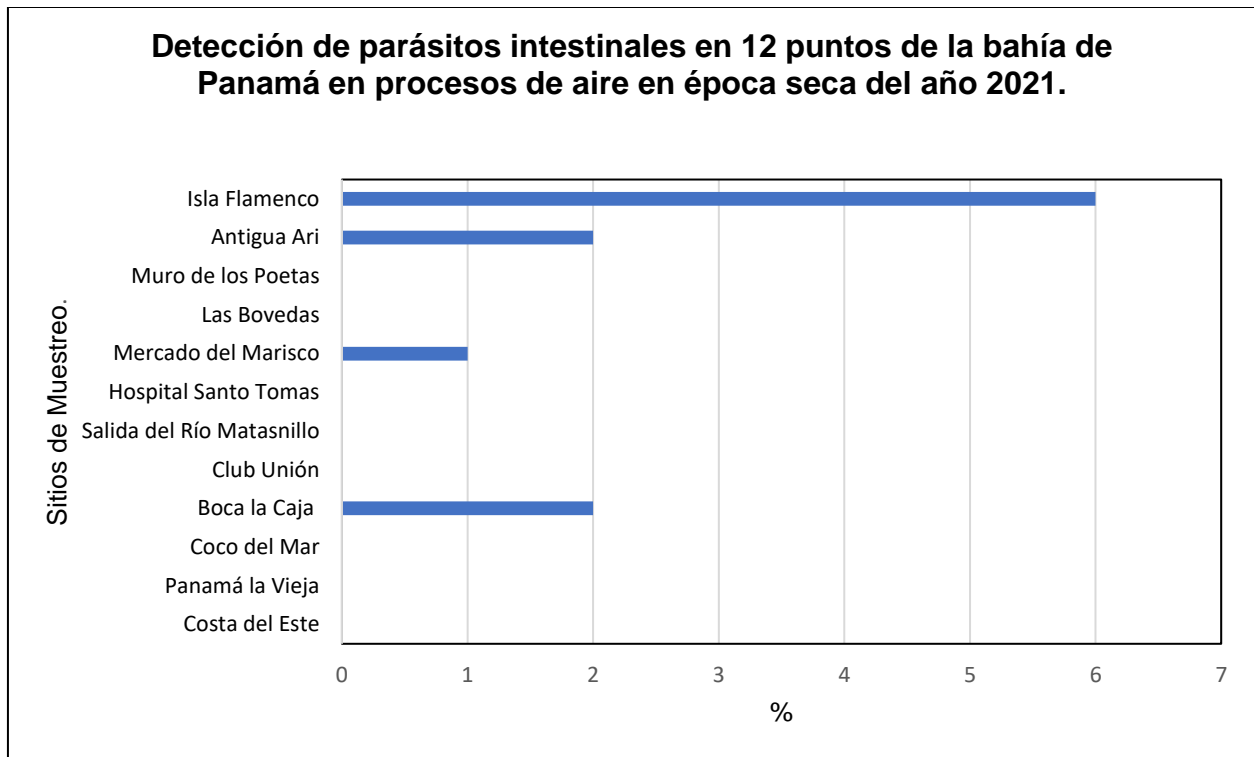
**Figura 2.** Espectro parasitario detectado en los 12 sitios de muestreo en la bahía de Panamá durante la estación seca de 2021.



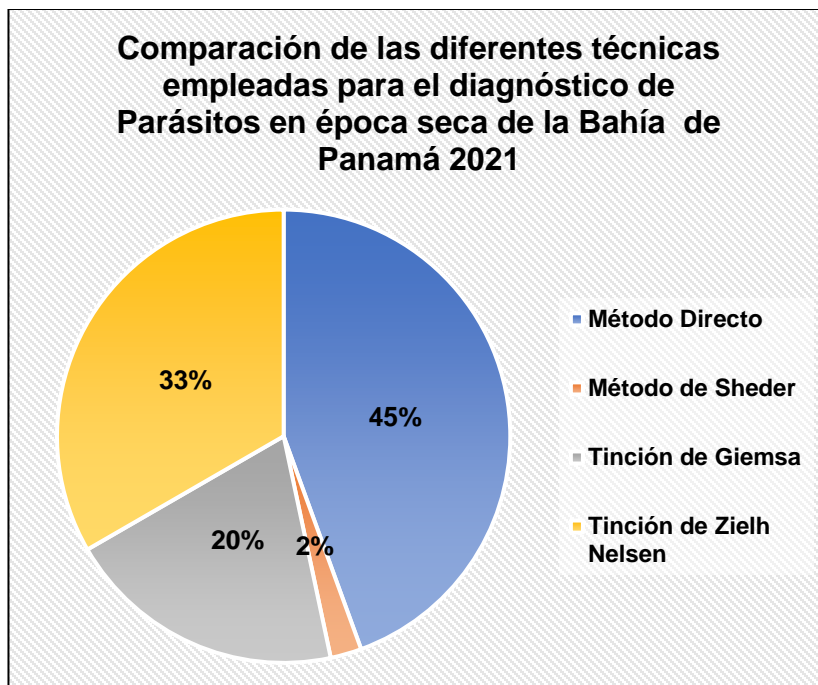
**Figura 3.** Prevalencia de protozoos en muestras de agua y aire en 12 estaciones de muestreo de la Bahía de Panamá.



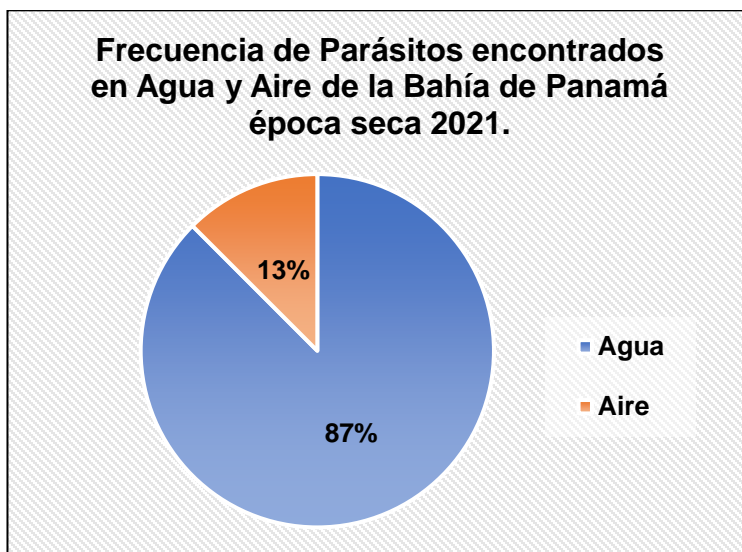
**Figura 4.** Detección de parásitos intestinales en 12 puntos de la Bahía de Panamá en muestras de agua y aire durante la estación seca de 2021.



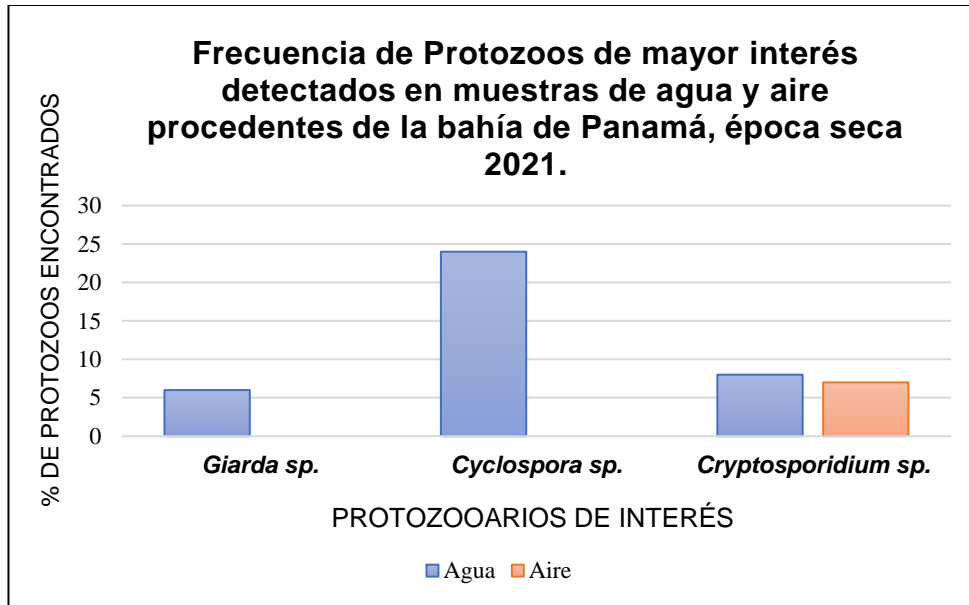
**Figura 5.** Detección de parásitos intestinales en 12 puntos de la Bahía de Panamá en muestras de aire durante la estación seca de 2021.



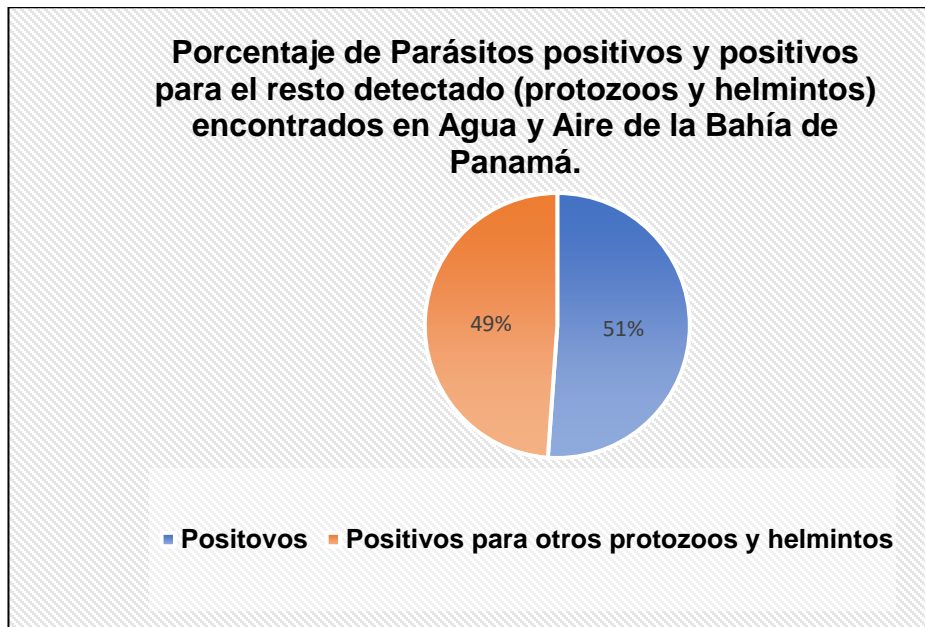
**Figura 6.** Comparación porcentual de detección según técnica empleada para el diagnóstico de formas parasitarias, en la estación seca de la bahía de Panamá 2021.



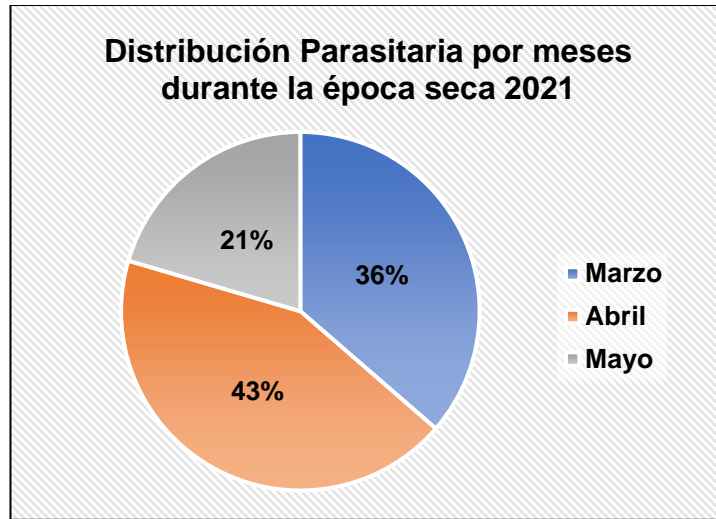
**Figura 7.** Comparación porcentual de parásitos detectados en muestras de agua y aire, en la estación seca de la bahía de Panamá 2021.



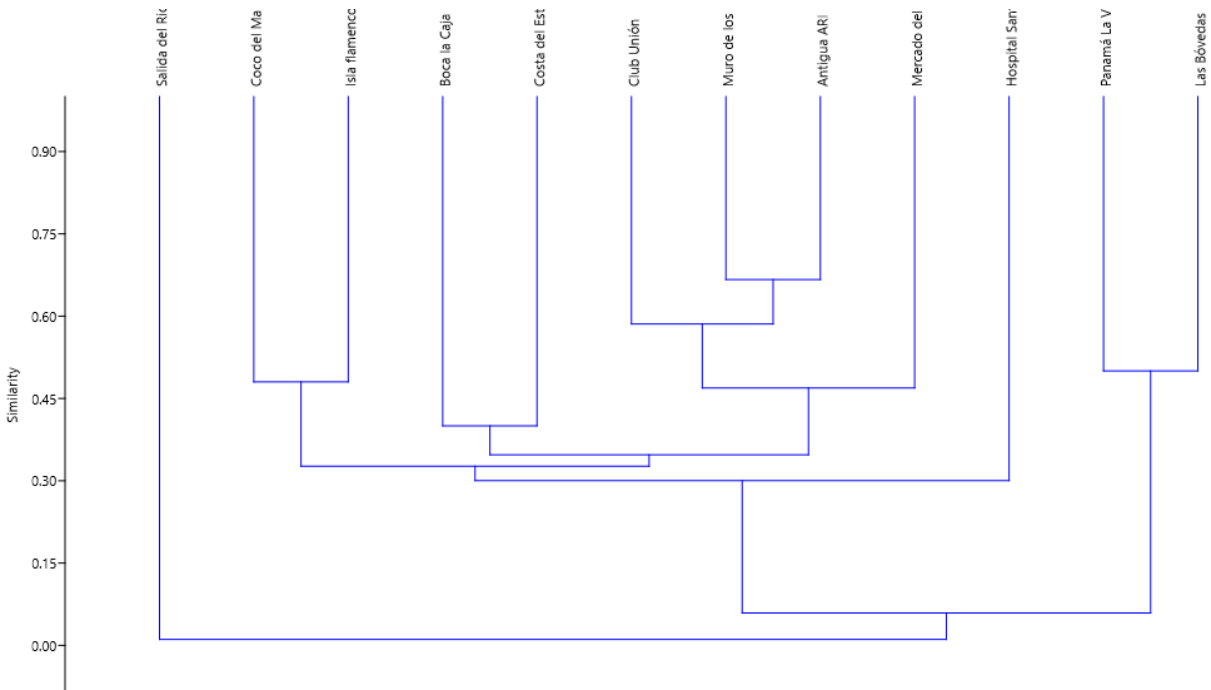
**Figura 8.** Protozoos de mayor interés detectados en muestras de agua y aire procedentes de la bahía de Panamá, estación seca 2021.



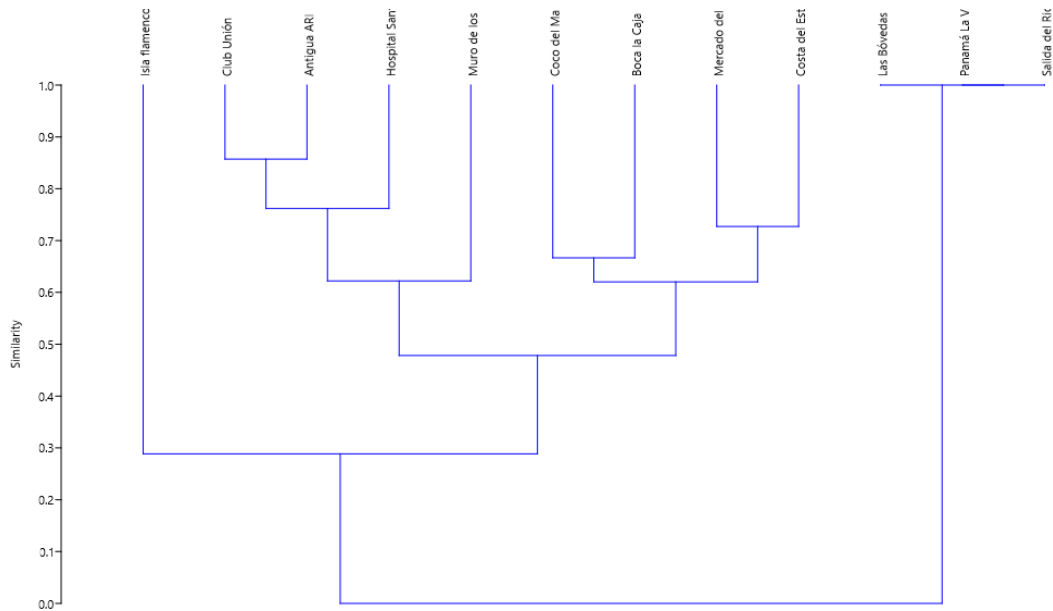
**Figura 9.** Comparación porcentual de parásitos con mayor interés, siendo nuestros positivos, (*Giardia sp.*, *Cyclospora sp.* y *Cryptosporidium sp.*) en comparación del resto detectado (positivos para otros protozoos y helmintos) en muestras de agua y aire, estación seca de la bahía de Panamá 2021.



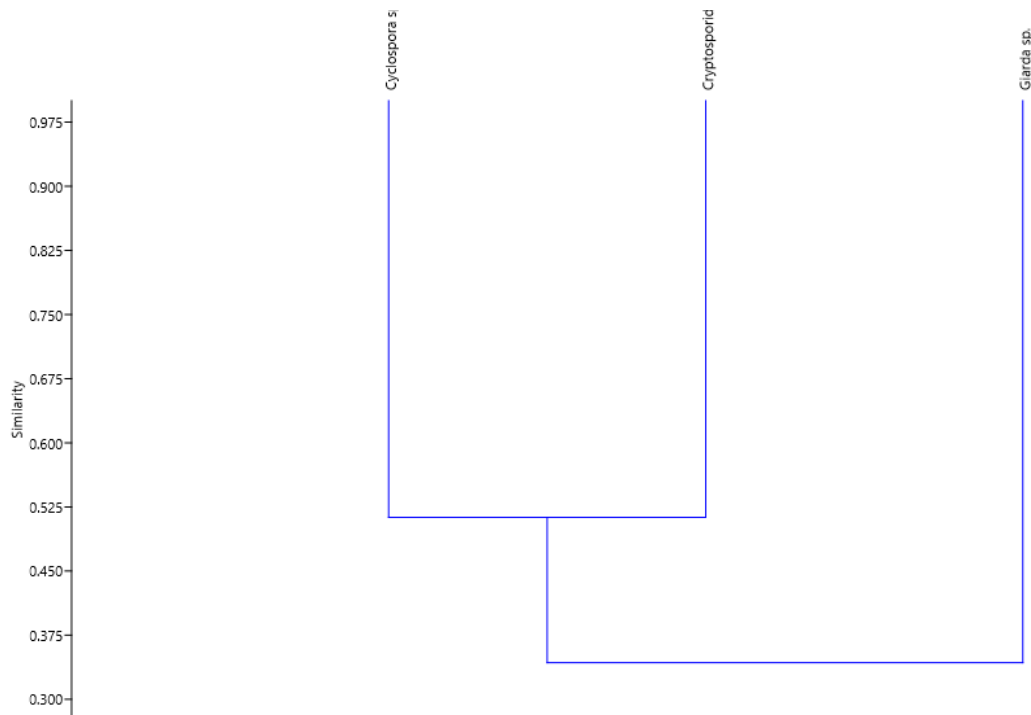
**Figura 10.** Comparación porcentual de la distribución total por mes de los parásitos intestinales detectados en la estación seca de la bahía de Panamá 2021.



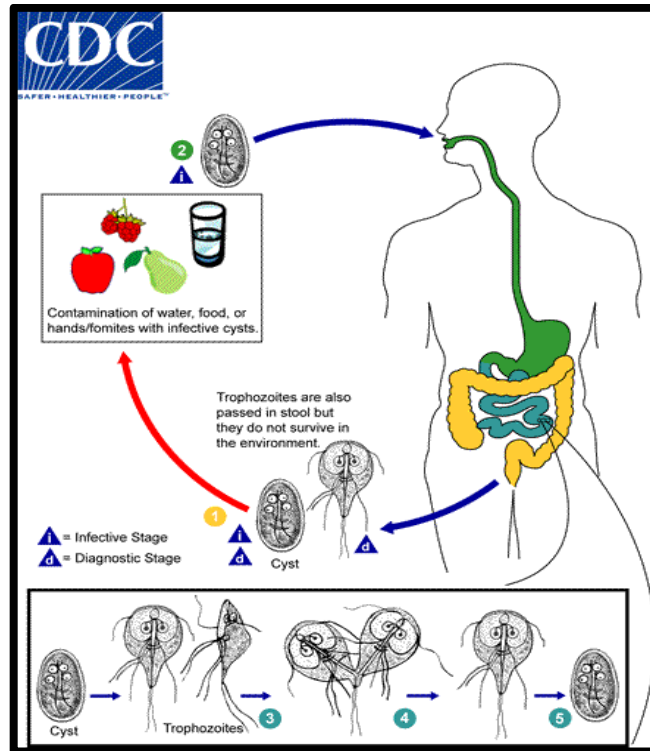
**Figura 11.** Análisis de similitud de Bray-Curtis para los 12 sitios de muestreo de la Bahía de Panamá.



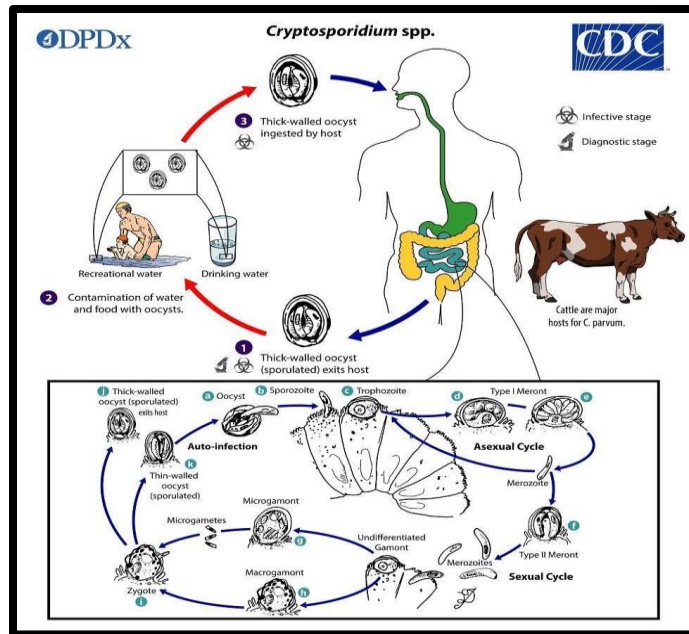
**Figura 12.** Análisis de similitud de Bray-Curtis para los puntos de muestreo por parásitos de interés (Positivos) detectados de la bahía de Panamá.



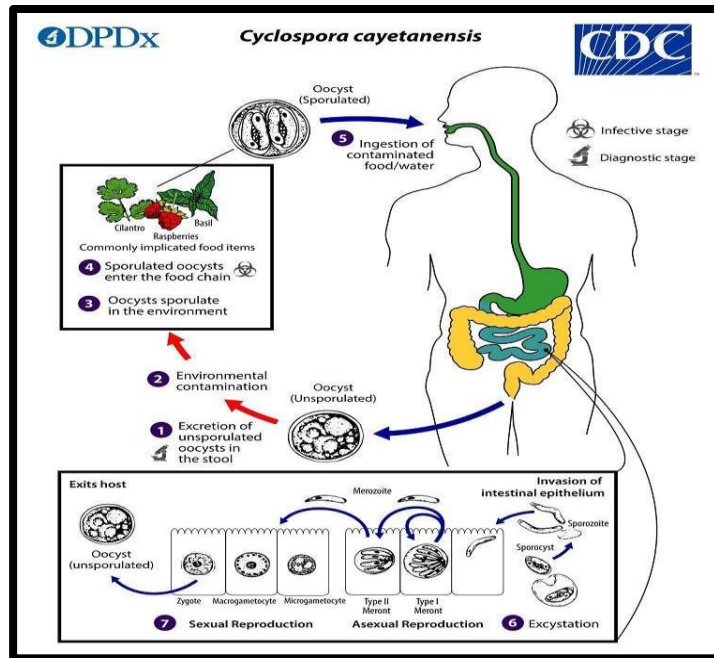
**Figura 13.** Análisis de similitud de Bray-Curtis para los parásitos de interés (Positivos) detectados de la bahía de Panamá.



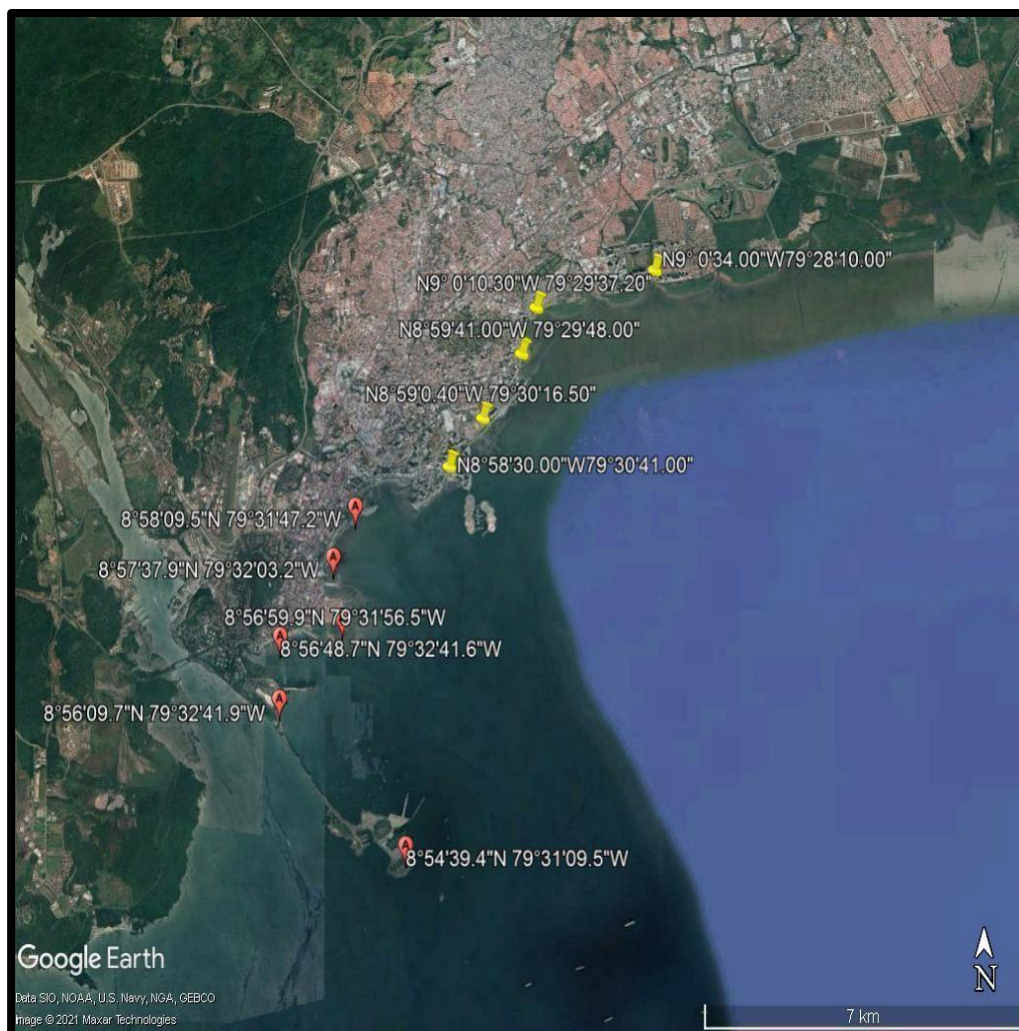
**Figura 14.** Ciclo de Vida de *Giardia* sp. Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>. ①. Los quistes son resistentes y pueden sobrevivir varios meses en agua fría. La infección se produce por la ingestión de quistes en agua contaminada, alimentos, o por vía fecal-oral (manos o fómites) ②. En el intestino delgado, la desenquistación libera trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos) ③. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal, permaneciendo en la luz del intestino delgado proximal donde pueden quedar libres o adheridos a la mucosa por un disco de succión ventral ④. El enquistamiento ocurre cuando los parásitos transitan hacia el colon. El quiste es la etapa que se encuentra más comúnmente en las heces no diarreicas. ⑤. Debido a que los quistes son infecciosos cuando se excretan en las heces o poco después, es posible la transmisión de persona a persona.



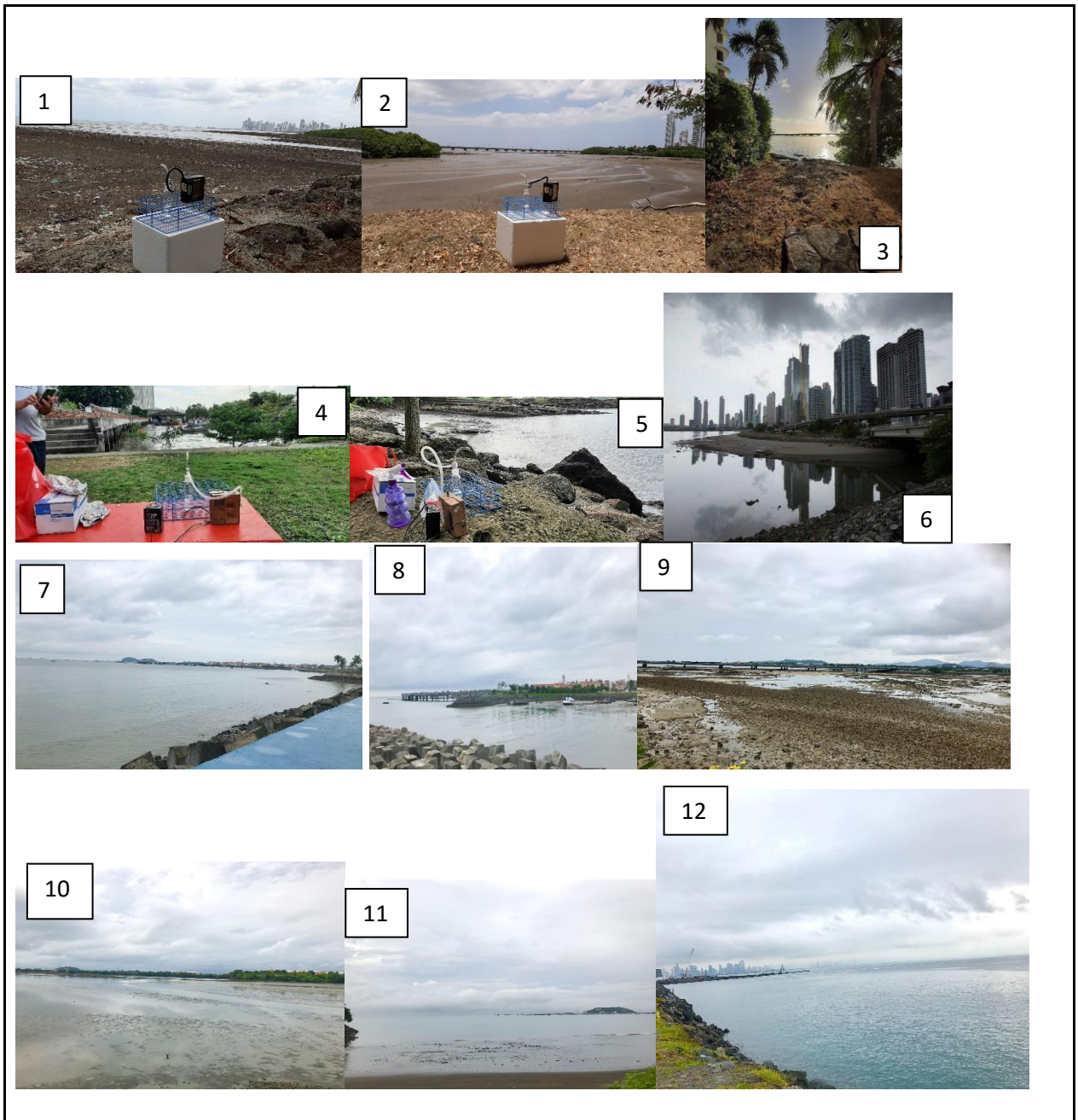
**Figura 15.** Ciclo de Vida de *Cryptosporidium* spp. Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>. Los ooquistes esporulados, que contienen 4 esporozoítos, son excretados por el huésped infectado a través de las heces **1** (y posiblemente por otras vías, como las secreciones respiratorias). Transmisión de *Cryptosporidium* spp. Ocurre principalmente a través de la ingestión de agua contaminada con heces (p. ej., agua potable o recreativa) o alimentos (p. ej., leche cruda) o después del contacto directo con animales o personas infectadas **2**. Después de la ingestión (y posiblemente la inhalación) por parte de un huésped adecuado **3**, se produce el desenquistamiento **a**. Los esporozoítos se liberan y parasitan las células epiteliales (**b**, **c**) del tracto gastrointestinal (y posiblemente del tracto respiratorio). En estas células, generalmente dentro del borde en cepillo, los parásitos se multiplican asexualmente (esquizogonía o merogonía) (**d**, **e**, **f**) y luego la multiplicación sexual (gametogonía) produciendo microgamonts (macho) **g** y macrogamonts (hembra) **h**. Tras la fertilización de los macrogamontes por los microgametos (**i** que se rompen del microgamonte, se desarrollan ooquistes y esporulan en el huésped infectado. Los cigotos dan lugar a dos tipos diferentes de ooquistes (de paredes gruesas y de paredes delgadas). Los ooquistes de paredes gruesas se excretan del huésped al medio ambiente **j**, mientras que los ooquistes de paredes delgadas participan en el ciclo autoinfeccioso interno y no se recuperan de las heces **k**. Los ooquistes son infecciosos al excretarse, lo que permite la transmisión fecal-oral directa e inmediata. Se han informado etapas extracelulares, pero su relevancia en el ciclo de vida general no está clara.



**Figura 16.** Ciclo de Vida de *Cyclospora* sp. Fuente: <https://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/biology.html>. Cuando recién se expulsa en las heces, el ooquiste no es infeccioso **1** (por lo tanto, la transmisión fecal-oral directa no puede ocurrir; esto diferencia a *Cyclospora* de otro importante parásito coccidiano, *Cryptosporidium*). En el medio ambiente **2**, la esporulación ocurre después de días o semanas a temperaturas entre 22 °C y 32 °C, lo que da como resultado la división del esporonte en dos esporocistos, cada uno con dos esporozoitos alargados **3**. Los ooquistes esporulados pueden contaminar los productos frescos y el agua **4** que luego se ingieren **5**. Los ooquistes se desenquistan en el tracto gastrointestinal, liberando los esporozoitos, que invaden las células epiteliales del intestino delgado. **6**. Dentro de las células se multiplican asexualmente en merontes tipo I y tipo II. Los merozoítos de merontes de tipo I probablemente permanecen en el ciclo asexual, mientras que los merozoítos de merontes de tipo II se desarrollan sexualmente en macrogametocitos y microgametocitos tras la invasión de otra célula huésped. Ocurre la fertilización y el cigoto se convierte en un ooquiste que se libera de la célula huésped y se elimina en las heces **7**. Todavía se desconocen varios aspectos de la replicación y el desarrollo intracelular, y los posibles mecanismos de contaminación de los alimentos y el agua aún están bajo investigación.



**Figura 17.** Ubicación satelital de las 12 estaciones de muestreo a lo largo de la Bahía de Panamá, desde Costa del Este hasta la Calzada de Amador.



**Figura 18.** Los 12 Puntos de muestreos a lo largo de la Bahía de Panamá.



**Figura 19.** Colecta de muestras de agua en diferentes puntos a lo largo de la Bahía de Panamá, con ayuda de un muestreador.



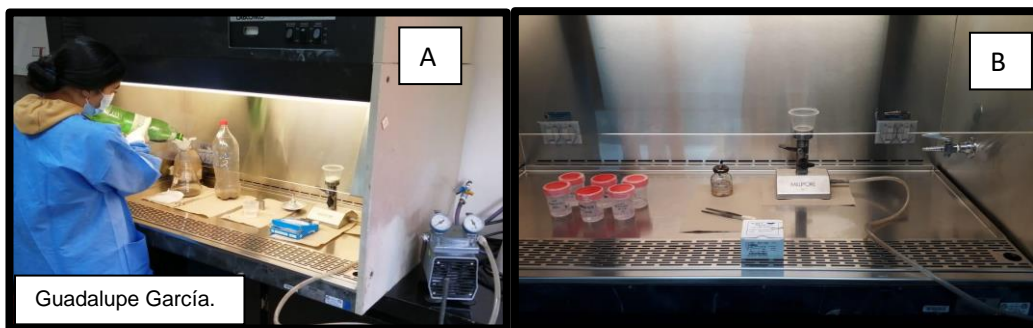
**Figura 20.** Colecta de muestras de aire de los diferentes puntos, mediante un Impinger AGI-30 que se encuentra conectado a una bomba de muestreo.



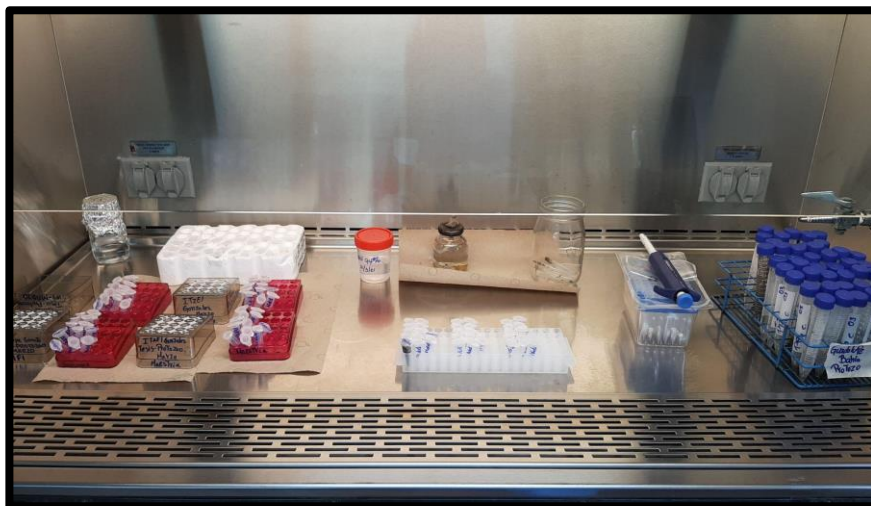
**Figura 21.** Muestras de agua colectadas en botellas de 2 litros a las cuales se les aplicó la técnica de sifoneo para la recolección de sedimentos.



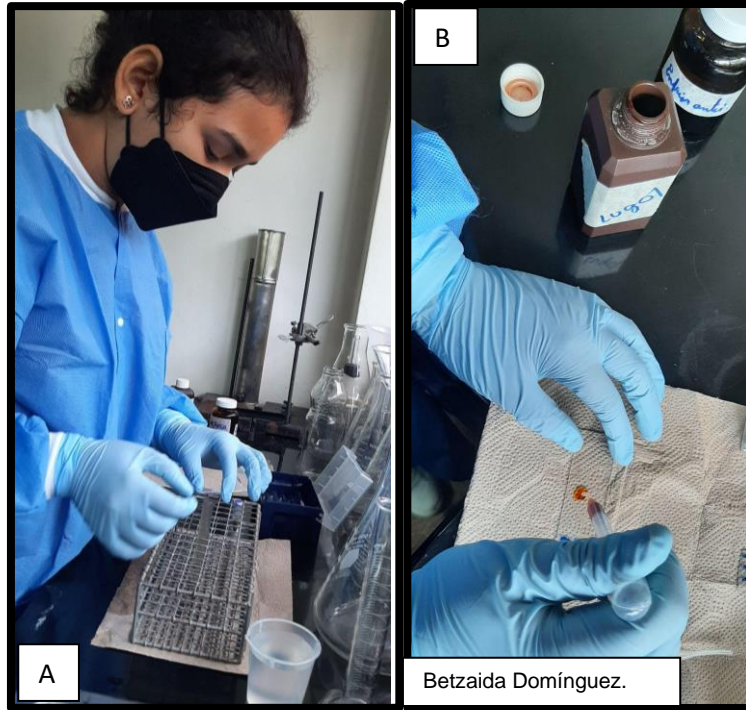
**Figura 22.** Proceso de filtración de muestras mediante el sistema de filtración al vacío utilizando la bomba millipore.



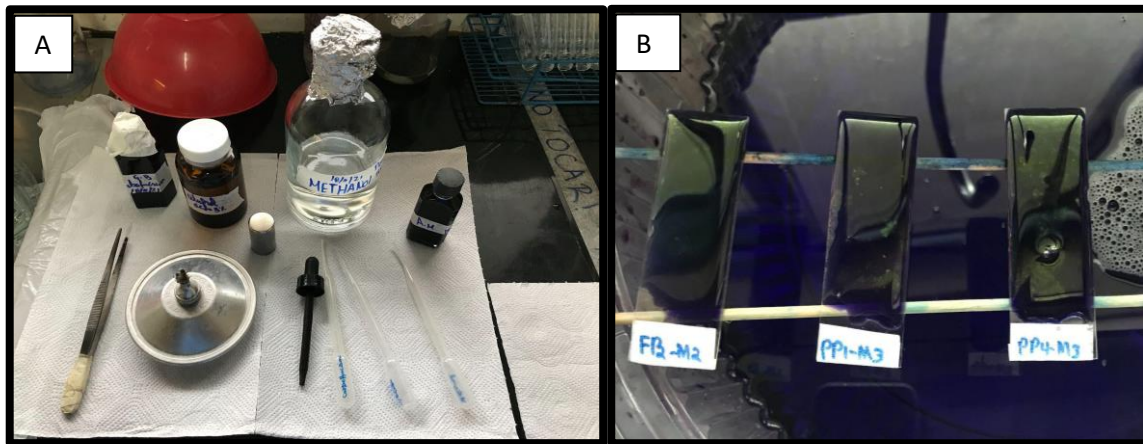
**Figura 23.** Proceso de Pre-filtrado de las muestras de a) agua y b) aire, utilizando filtros de membrana.



**Figura 24.** Muestras preservadas en formalina y glicerol en Falcon de 15 ml y tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml.



**Figura 25.** Métodos empleados para la observación de las muestras. a) Montaje de Flotación y b) Método directo.

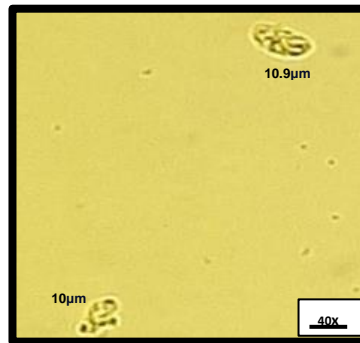


**Figura 26.** Tinciones aplicadas a las muestras de los diferentes puntos. a) Tinción ziehl neelsen, b) Tinción de Giemsa.

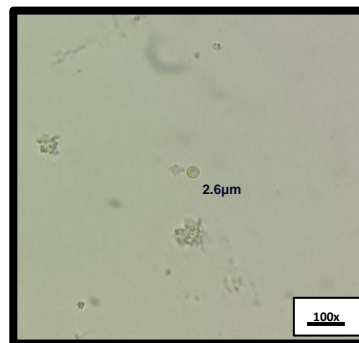


**Figura 27.** Revisión de muestras al microscopio utilizando un método por flotación.

## Parásitos encontrados en las muestras.



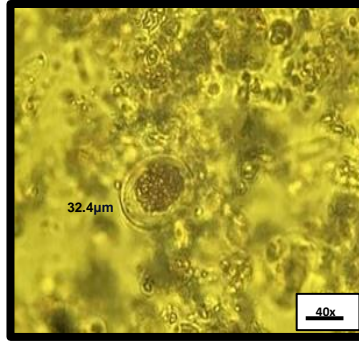
**Figura 28.** *Giardia* sp. observado mediante diagnóstico directo en muestra de agua del Mercado del Marisco.



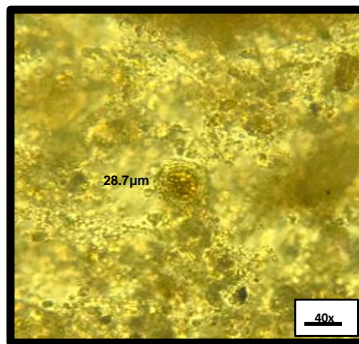
**Figura 29.** *Cryptosporidium* sp. observado mediante diagnóstico directo en muestra de aire en Isla Flamenco.



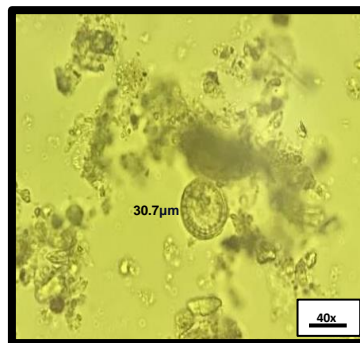
**Figura 30.** Ooquiste *Cyclospora* sp. inmaduro, observado mediante diagnóstico directo en muestra de agua de Coco del Mar.



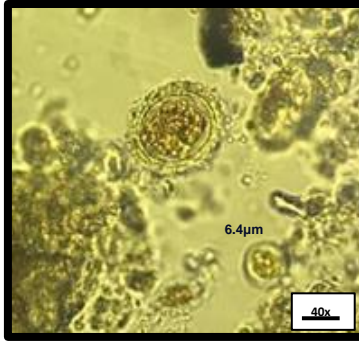
**Figura 31.** Huevo de *Ucinaria* sp. observado mediante diagnóstico directo en muestra de agua de Las Bóvedas.



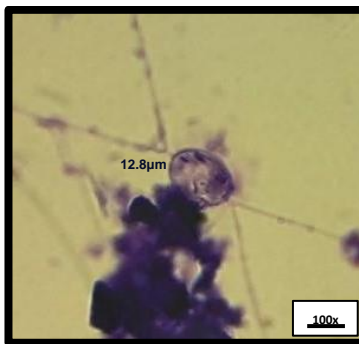
**Figura 32.** Huevo *Ascaris* sp. inmaduro, observado mediante diagnóstico directo en muestras de agua de Coco del Mar.



**Figura 33.** *Taenia* sp. observada mediante diagnóstico directo en muestra de agua de Isla Flamenco.



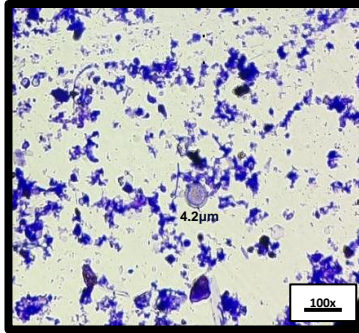
**Figura 34.** *Toxocara* sp y *Cyclospora* sp. observada mediante diagnóstico directo en muestras de agua de Isla Flamenco.



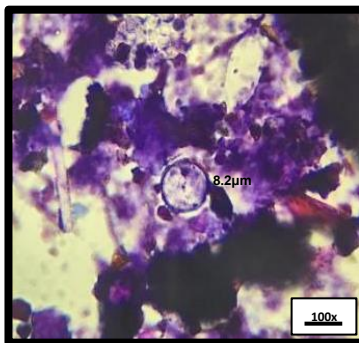
**Figura 35.** *Giardia* sp. observada mediante la tinción de Giemsa en muestras de agua obtenidas del Mercado del Marisco.



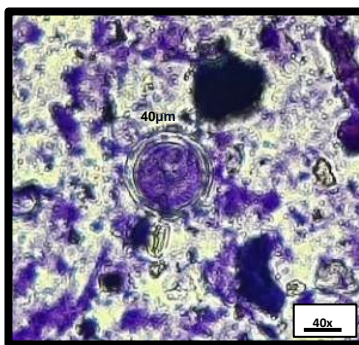
**Figura 36.** Quiste de *Entamoeba* sp. observado mediante la tinción Giemsa en muestra de agua de Boca La Caja.



**Figura 37.** Ooquiste de *Cryptosporidium* sp. observada mediante la tinción de Giemsa, en muestra de agua de boca la caja.



**Figura 38.** *Cyclospora* sp. observada mediante la tinción de Ziehl-Neelsen en muestra de agua de Coco del Mar.



**Figura 39.** Quiste de *Balantidium coli*. observado mediante la tinción de Giemsa en muestra de agua de Costa del Este.