

REFUERZO DE LAS CAPACIDADES Y COMPETENCIAS RELATIVAS A LA GESTIÓN DE LOS RECURSOS HÍDRICOS EN ISLAS



ISLHáGUA



União Europeia
FEDER



Investimos no seu futuro

PROGRAMA
MAC 2007 - 2013
Cooperación Transnacional

Jefe de Fila:

Socios Canarias:

Socios Cabo Verde:



Patógenos transmitidos por el agua: potables, residuales y regeneradas

Praia-Isla Santiago, 18 de Septiembre 2013

Dr. Néstor Abreu Acosta

Patógenos transmitidos por el agua

- Medio acuático
- Componentes biológicos de las aguas
- Tipos de aguas
- Bacterias patógenas
- Protozoos parásitos
- Helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en aguas



Investimos no seu futuro



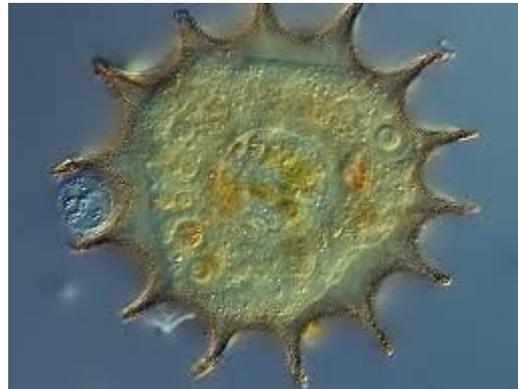
Medio acuático

- Imprescindible para la vida
- Permite la supervivencia de seres vivos protegidos
- No siempre permite la multiplicación
- Disolvente universal (seres vivos y nutrientes)
- Riqueza y cuantía de seres vivos:
 - Diferentes condiciones físico/químicas:
 - T^a, pH, concentración de sales...
 - Contaminantes
 - Tipo de nutrientes disponibles
 - Cantidad de nutrientes
 - Otros seres vivos



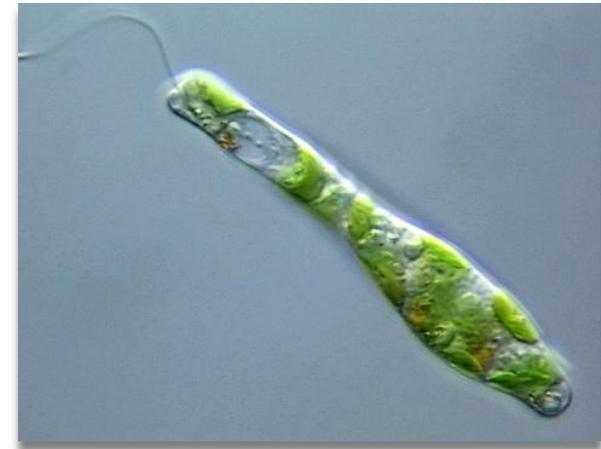
Componentes biológicos de las aguas

- Medio rico en microorganismos autóctonos o alóctonos
 - Amebas, cianobacterias, algas



Componentes biológicos de las aguas

- Ciliados y flagelados



Componentes biológicos de las aguas

- Invertebrados



Componentes biológicos de las aguas

- Microorganismos patógenos (proporción mínima)
Heces, orina, desechos de animales...
- Características importantes:
 - Estables en el agua
 - Capacidad de recrecimiento
 - Alta resistencia a condiciones adversas
- ✓ Bacterias
- ✓ Parásitos
- ✓ Virus
- ✓ Algas tóxicas

Componentes biológicos de las aguas

Patógenos en heces

ORGANISMO	gr. heces
Protozoos parásitos	10^6-10^7
<i>Ascaris</i>	10^4-10^5
Enterovirus	10^3-10^7
Rotavirus	10^{10}
Adenovirus	10^{11}
<i>Salmonella</i> spp.	10^4-10^{10}

Tipos de aguas

- En función del contacto con el hombre
 - Aguas de consumo
 - Aguas recreativas
 - Aguas residuales/depuradas/regeneradas
 - Otras: Fuentes ornamentales, aguas industriales



• Agua de consumo:

- Fuentes principales: aguas superficiales y profundas
- Aguas subterráneas:
 - Mayor calidad microbiológica: Composición microbiana variable
 - Bacterias heterotróficas/oligotróficas dominan
 - Bacterias en estado durmiente
- Aguas superficiales:
 - 80% de agua dulce disponible
 - Mayor facilidad de contaminación
 - Mayor concentración de sustancias orgánicas
 - Bacterias en estado durmiente



Tipos de aguas

• Agua de consumo:

• Agua de lluvia:

- No contiene microorganismos
- Contaminación en los sistemas de recogida



• Agua de desalinización

- Alta calidad microbiológica
- Corrección de pH

• Agua embotellada:

- Aguas potables de origen subterráneo
- Características aptas para el consumo
- Poseen una flora autóctona
- Efecto botella
- Los contaminantes más habituales son bacterias, hongos y protozoos
 - *Pseudomonas* ssp..
 - *Acinetobacter* sp.
 - *Bacillus* sp....etc.



Tipos de aguas

• Aguas recreativas:

- Contaminantes de origen fecal
 - Aguas residuales mal tratadas
 - Filtraciones de aguas residuales
 - Contaminación con abonos
- Agentes implicados:
 - Enteropatógenos
 - Productores de dermatitis
 - Afecciones del SNC



• Aguas residuales:

- Fuente más importante de contaminación hídrica
- Materia orgánica, microorganismos, detergentes...
- AARR domésticas
- AARR industriales
- AARR agrícolas
- Necesidad de tratamiento



Enfermedades de origen hídrico

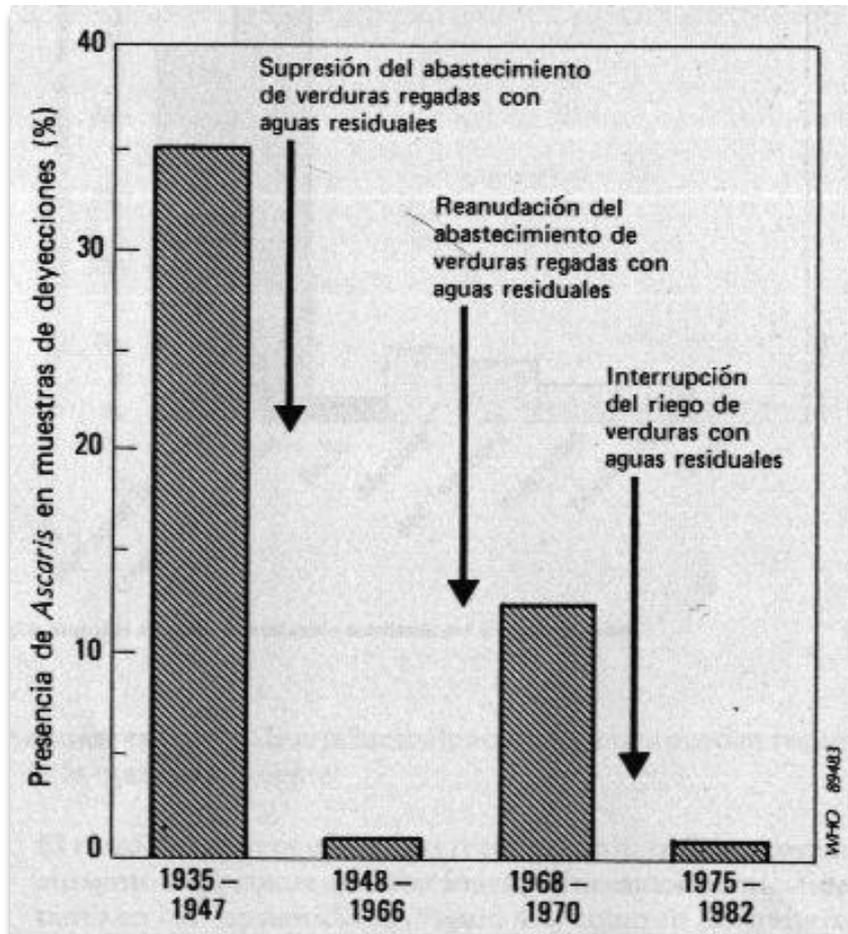
- Contaminación por excrementos humanos/animales y AARR
 - Gran capacidad disolvente
 - Gran potencial de transmisión de enfermedades
- Contaminación fecal: exposición a gran variedad de microorganismos patógenos
- Organismos no patógenos: ocasionales infecciones de tipo oportunista
- 500 x 10⁶ infecciones entéricas por mal saneamiento
- Consumo de agua insalubre:
 - 80% enfermedades infecciosas gastrointestinales
 - 1/3 parte de las defunciones
 - Razones:
 - Falta de higiene
 - Carencia de servicios sanitarios
- Un buen saneamiento del abastecimiento evita epidemias de origen hídrico
- Buen plan de reutilización de AARR

Enfermedades de origen hídrico

- Incremento de la reutilización de AARR y AADD
- Grandes beneficios
 - Aumento de la cantidad de recursos hídricos
 - Continuidad
 - Fuente de nutrientes
 - Aumento de la producción
- Aguas reutilizadas con distinto grados de depuración
- Inconveniente: presencia de patógenos
- Control apropiado del uso

Enfermedades de origen hídrico

Reutilización de AARR/AADD:



Presencia de *Ascaris* en la población de Jerusalén en función del riego con aguas residuales

Enfermedades de origen hídrico

- Transmitidas por el agua
- Vinculadas con la falta de higiene
- Con base u originadas en el agua
- Transmitidas por vectores de hábitat acuático
- Diseminadas por el agua

Enfermedades de origen hídrico

- Transmitidas por el agua:
 - Ingestión de agua contaminada
 - Ingestión directa
 - Ingestión indirecta
 - Accidental



Enfermedades de origen hídrico

- Vinculadas con la falta de higiene:
 - Escasez o inaccesibilidad del agua para la higiene
 - Alta incidencia de enfermedades:
 - Diarreicas
 - Cutáneas
 - Oculares
- Disminución de enfermedades con abastecimiento adecuado



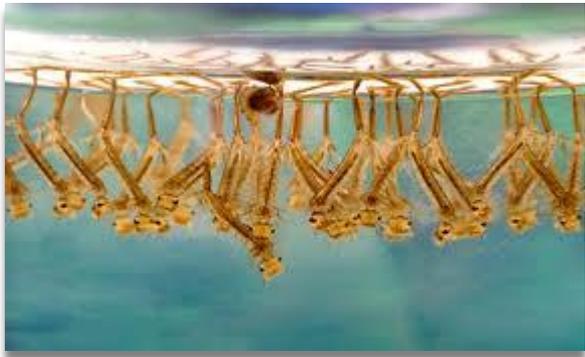
Enfermedades de origen hídrico

- Con base u originadas en el agua:
 - Organismos con parte de su ciclo vital en el agua
 - Otra parte como parásitos
 - Agua contaminada o no por heces
 - Enfermedades no mortales con alta incapacidad
 - Aumento de la incidencia por obras hidráulicas



Enfermedades de origen hídrico

- Transmitidas por vectores de hábitat acuático:
 - Hábitat o área de reproducción del vector
 - Aguas contaminadas y no contaminadas
 - La desinfección no influirá sobre estas enfermedades



Enfermedades de origen hídrico

- Transmitidas por vectores no acuáticos:

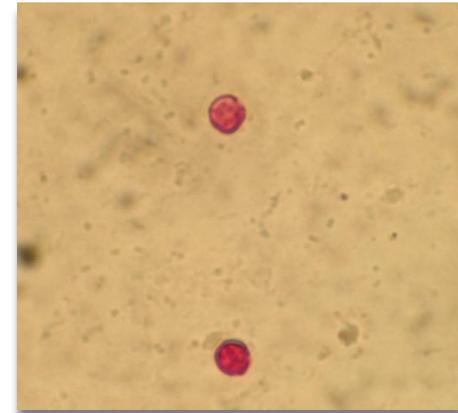
DOI: 10.2478/s11686-009-0008-4
© 2009 W. Stefański Institute of Parasitology, PAS
Acta Parasitologica, 2009, 54(1), 1–5; ISSN 1230-2821


VERSITA

Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in pigeons (*Columba livia*)

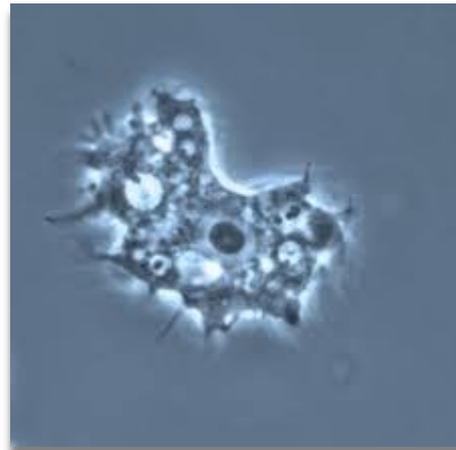
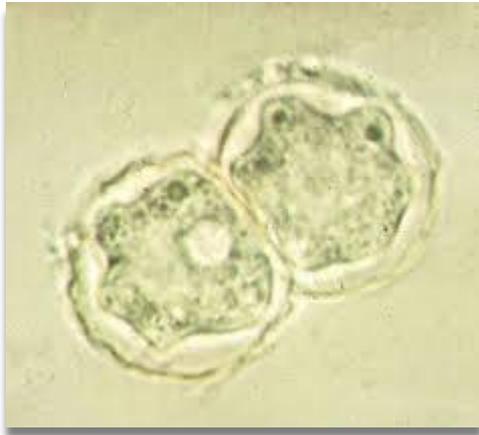
Néstor Abreu-Acosta*, Pilar Foronda-Rodríguez, Mercedes López and Basilio Valladares

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Avda. Astrofísico F. Sánchez, s/n 38203,
La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain



Enfermedades de origen hídrico

- Diseminadas por el agua:
 - Infección a través de las vías respiratorias
 - *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba culberstoni*
 - *Legionella* spp.
 - Desinfección sólo en piscinas



Enfermedades de origen hídrico

- Exposición a gran cantidad de microorganismos
- Pocos capaces de producir enfermedad
- Transmisión rápida en enfermedades hídricas
 - Mal medio de cultivo
 - Mecanismos de autodepuración
 - Escasa supervivencia y multiplicación de microorganismos
- Susceptibilidad a las infecciones:
 - Edad
 - Higiene personal
 - Acidez gástrica
 - Moco e integridad del epitelio
 - Motilidad intestinal
 - Inmunidad
 - Otros factores epidemiológicos secundarios

Bacterias patógenas

- Origen fecal
 - Transmisión por vía oral
 - No se pueden multiplicar en el ambiente
 - Baja resistencia al cloro
 - Dosis infectiva alta
 - Tiempo de persistencia corto o moderado
 - Reservorios animales
- Origen ambiental (oportunistas)
 - Vía oral, inhalación, piel, mucosas, ojos, oídos, nariz
 - Se multiplican en el ambiente
 - Resistencia al cloro leve/moderada
 - Sin reservorios animales

Bacterias patógenas

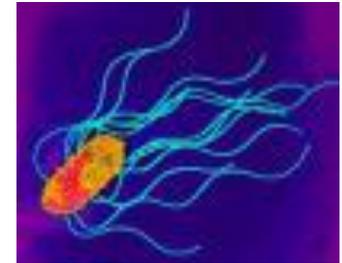
Bacterias	Fuente	Periodo de incubación	Duración	Síntomas clínicos
<i>Salmonella typhi</i>	Heces, orina	7 - 28 días (14)	5 - 7 días (semanas – meses)	Fiebre, tos, náusea, dolor de cabeza, vómito, diarrea
<i>Salmonella sp.</i>	Heces	8 - 48 horas	3 - 5 días	Diarrea acuosa con sangre
<i>Shigella sp.</i>	Heces	1 - 7 días	4 - 7 días	Disentería (diarrea con sangre), fiebres altas, síntomas tóxicos, retortijones, pujos intensos e incluso convulsiones.
<i>Vibrio cholerae</i>	Heces	9 - 72 horas	3 - 4 días	Diarrea acuosa, vómito, deshidratación
<i>V. cholerae</i> No.-01	Heces	1 - 5 días	3 - 4 días	Diarrea acuosa
<i>E. coli</i> enterohemorrágica O157:H7	Heces	3 - 9 días	1 - 9 días	Diarrea acuosa con sangre y moco, dolor abdominal agudo, vómitos, no hay fiebre
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Heces	8 - 24 horas	1 - 2 semanas	Diarrea, fiebre, cefalea, mialgias, dolor abdominal, a veces las heces son mucosas y con sangre
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Heces	5 - 48 horas	3 - 19 días	Dolores abdominales, diarrea acuosa, fiebre con escalofríos, náusea, mialgia
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Heces, orina	1- 11 días (24 - 48 horas)	1 - 21 días (9)	Dolor abdominal, diarrea con moco, sangre, fiebre, vómito
<i>Campylobacter jejuni</i>	Heces	2 - 5 días (42 - 72 horas)	7 - 10 días	Diarrea, dolores abdominales, fiebre y algunas veces heces fecales con sangre, dolor de cabeza
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Heces	20 - 24 horas	1 - 2 días	Fiebre, escalofríos, dolor abdominal, náusea, diarrea o vómito
<i>Aeromonas sp.</i>	Heces	Desconocido	1 - 7 días	Diarrea, dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza y colitis, las heces son acuosas y no son sanguinolentas

Bacterias patógenas

- N° de bacterias/gr :
 - *E. coli*: 10^8
 - *Salmonella* sp.: 10^6
 - *C. jejuni*: 10^7
 - *V. cholerae*: 10^6
- Tiempo de supervivencia:
 - *E. coli*: 90 días
 - *Salmonella* sp. : 90 días
 - *Shigella* sp.: 30 días
 - *C. jejuni* : 7 días
 - *V. cholerae*: 30 días



Campylobacter jejuni



Salmonella sp.

- Dosis infectiva:
 - *E. coli*: 10^2 - 10^9
 - *Salmonella* sp.: 10^7
 - *V. cholerae*: 10^3

	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Bacterias	0-1 \log_{10}	1-2 \log_{10}	0-2 \log_{10}	0-2 \log_{10}	1-2 \log_{10}	2-6 \log_{10}	1-6 \log_{10}

Bacterias patógenas

- Bacterias emergentes:

- *E. coli* 0157:H7

- No hidroliza el MUG
- Asociada al consumo de alimentos
- Colitis hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico
- Detección mediante filtración por membrana complicada
- No fermenta el sorbitol
- Confirmación con API o anticuerpos

- *H. pylori*

- Gastritis /úlceras duodenales / carcinoma gástrico
- Escasa información
 - Posible transmisión fecal oral
 - Buena sensibilidad al cloro
- Detección en aguas complicada (estado latente)



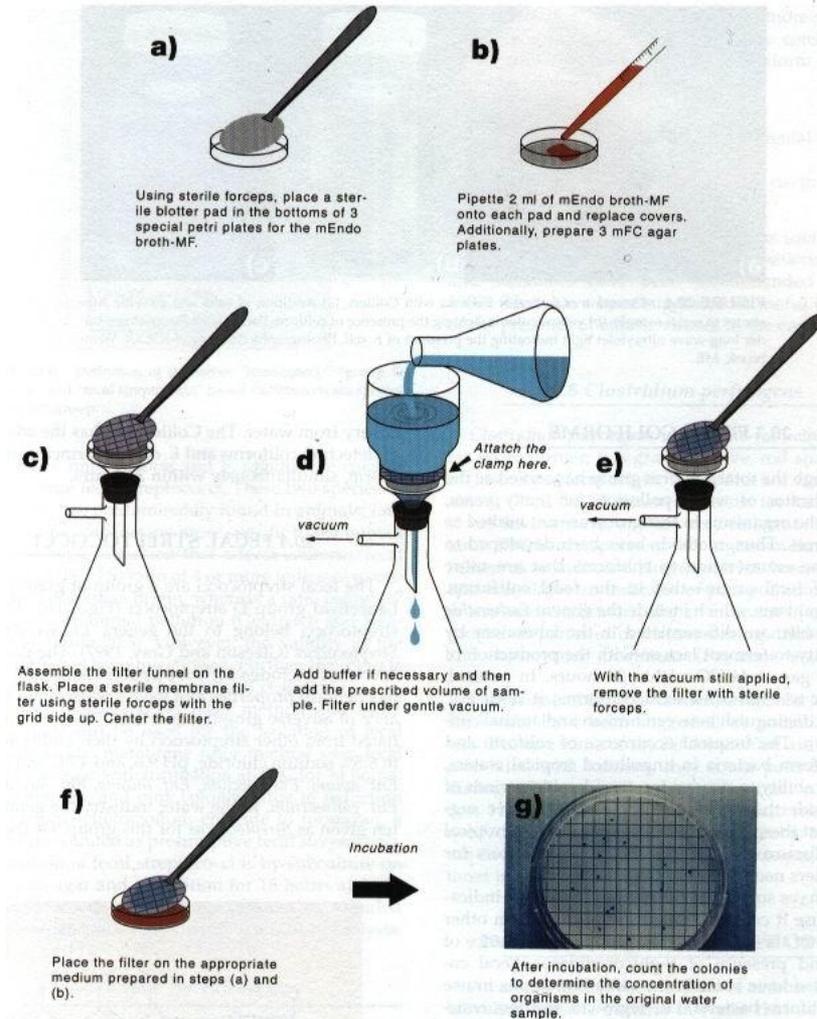
E. coli



Bacterias patógenas

- Bacterias emergentes:
 - *Aeromonas sp.*
 - Manifestaciones clínicas intestinales
 - Métodos de detección similares a coliformes
 - Multiplicación ambiental (TOC y niveles bajos desinfectante)
 - Desarrollo de biofilms
 - *Mycobacterium sp.*
 - Manifestaciones clínicas variables
 - Cierta resistencia a la desinfección
 - Detección en aguas complicada (estado latente)
 - Detección por medios selectivos e inhibitorios
 - Tratamiento para eliminación de flora acompañante
 - Periodo largo de incubación

Bacterias patógenas



- Fase de resucitación
- Fase de enriquecimiento
- Fase de crecimiento selectivo
- Identificación



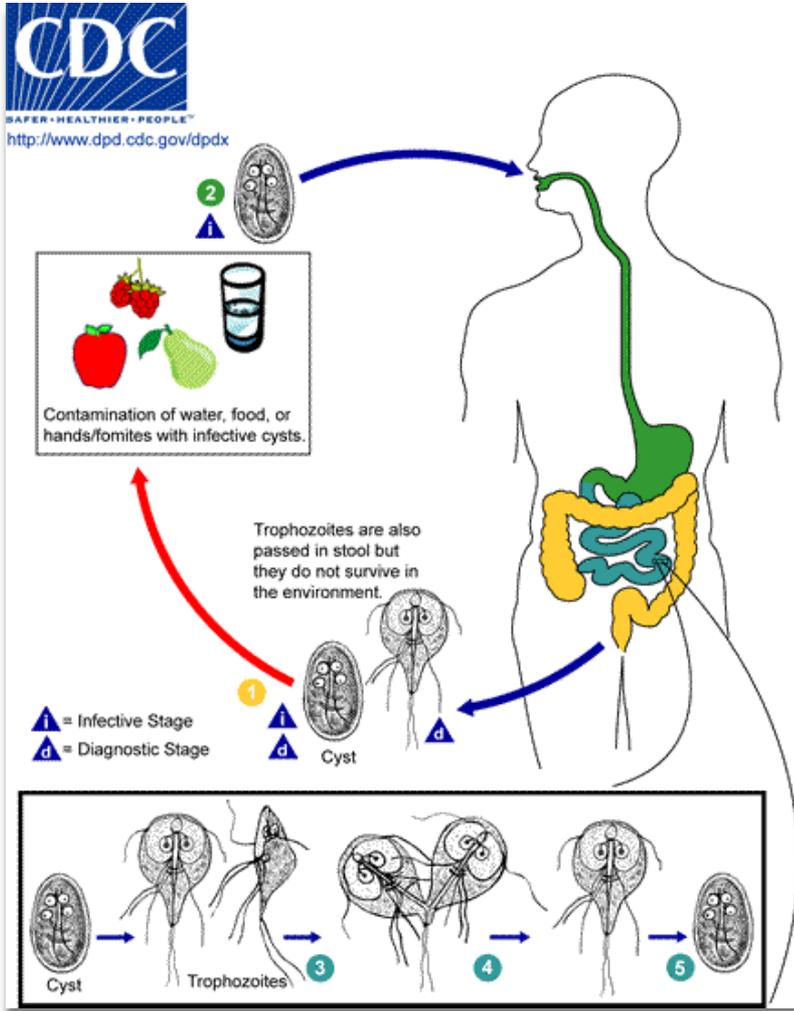
Protozoos parásitos

- Organismos eucariotas unicelulares
- Características epidemiológicas de los protozoos parásitos:
 - ✓ Alta excreción de ooquistes al ambiente
 - ✓ Dosis infectiva baja (ID_{50} : 10-1042 ooquistes)
 - ✓ Baja respuesta inmunitaria
 - ✓ Estabilidad en el ambiente (Mayor estabilidad a temperaturas moderadas)
 - ✓ Alta presencia en animales
 - ✓ Alta presencia en aguas ambientales
 - ✓ Resistentes a la desinfección:
 - Cloro poca efectividad
 - Ozono mayor efectividad
 - U.V
 - Mejor opción: Filtración (previa floculación-coagulación)

Protozoos parásitos

Protozoos y otros organismos	Enfermedad principal	Origen
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis	H. humanas y animal
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Criptosporidiosis	H. humanas y animal
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amebiana	H. humanas y animal
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Gastroenteritis	H. humanas
Microsporidios	Gastroenteritis	H. humanas y animal
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Encefalitis granulomatosa amebiana, keratitis	Tierra, agua y aire
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalitis primaria amebiana	Tierra y agua

Protozoos parásitos



Giardia duodenalis

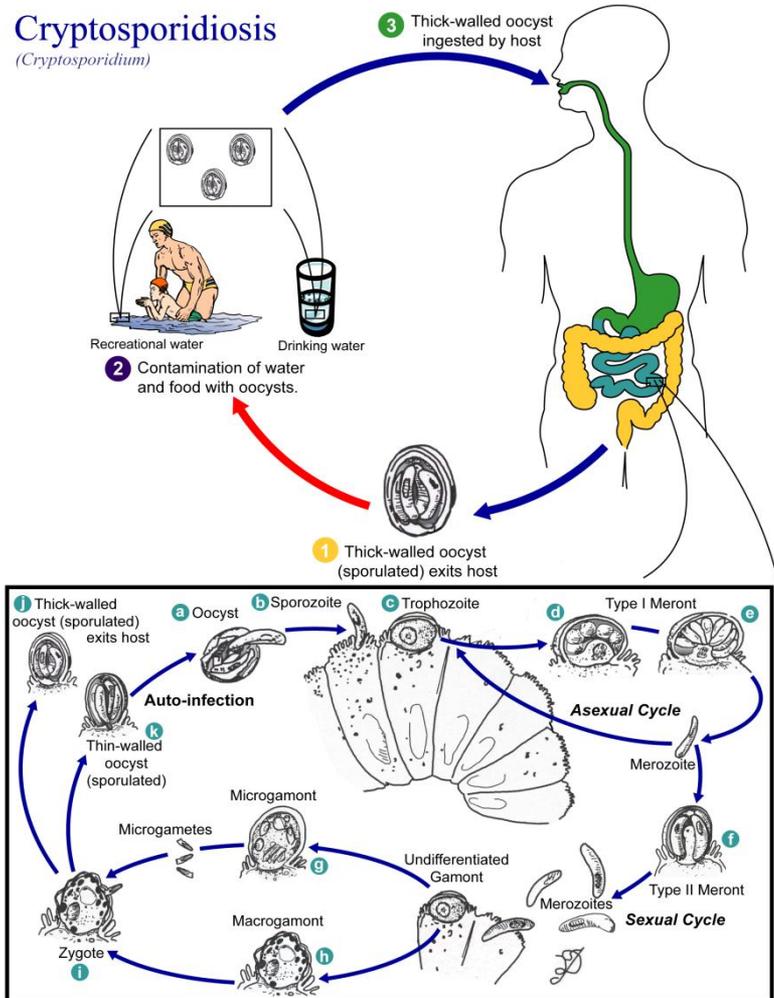
• Características biológicas para la transmisión hídrica:

- ✓ Gran excreción de quistes (10^6 - 10^8)
- ✓ Especificidad media/baja
- ✓ Quistes muy robustos
- ✓ Pequeño tamaño
- ✓ Baja dosis infectiva



Protozoos parásitos

Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium*)



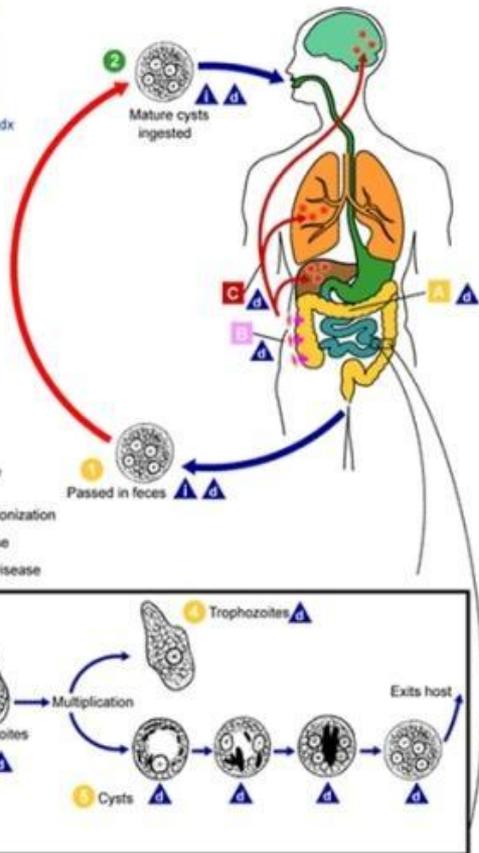
Cryptosporidium sp.

• Características biológicas para la transmisión hídrica:

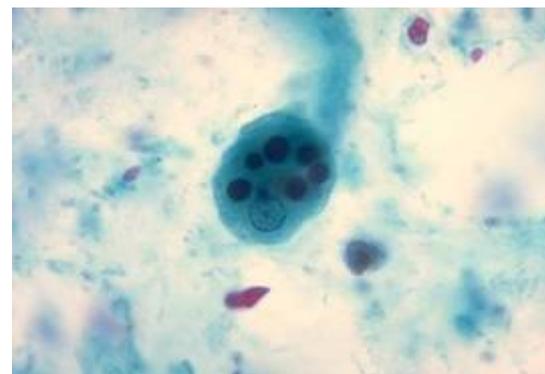
- ✓ Gran excreción de ooquistes
- ✓ Especificidad baja (muchos reservorios)
- ✓ Ooquistes muy robustos
 - Viables más de 6 meses
 - Resistentes a los desinfectantes
- ✓ Pequeño tamaño
- ✓ Baja dosis infectiva



Protozoos parásitos



Entamoeba histolytica

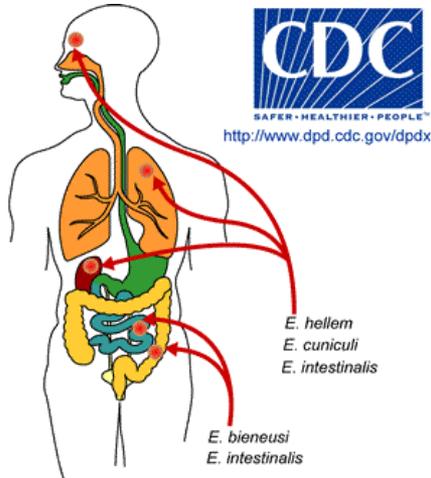


135

(c) 2008, Jeffrey Griffiths, MD, MPH

Protozoos parásitos

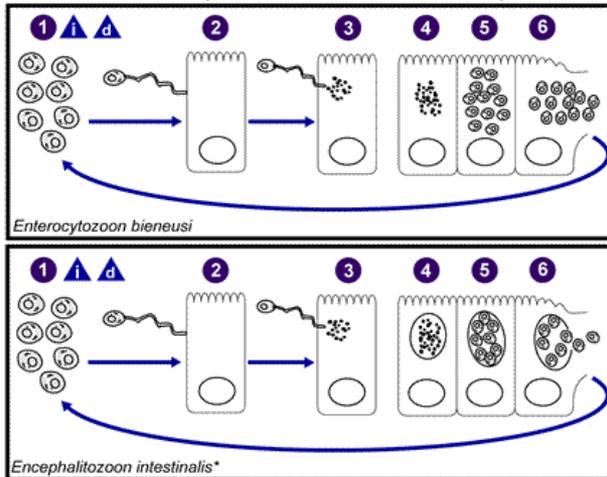
▲ = Infective Stage
 ▲ = Diagnostic Stage



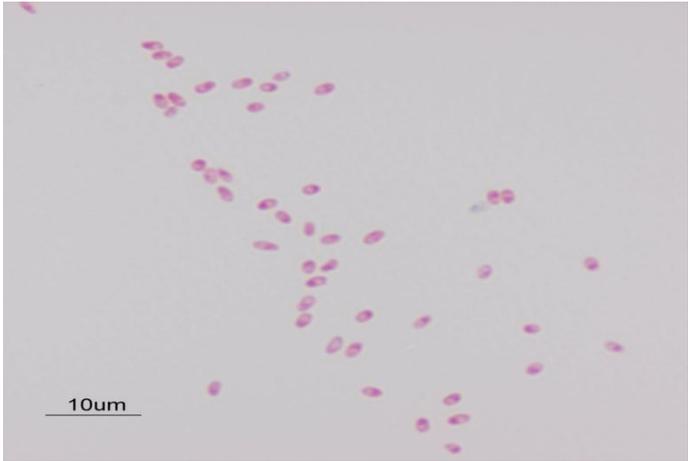
Microsporidios



Intracellular development of *E. bienersi* and *E. intestinalis* spores.

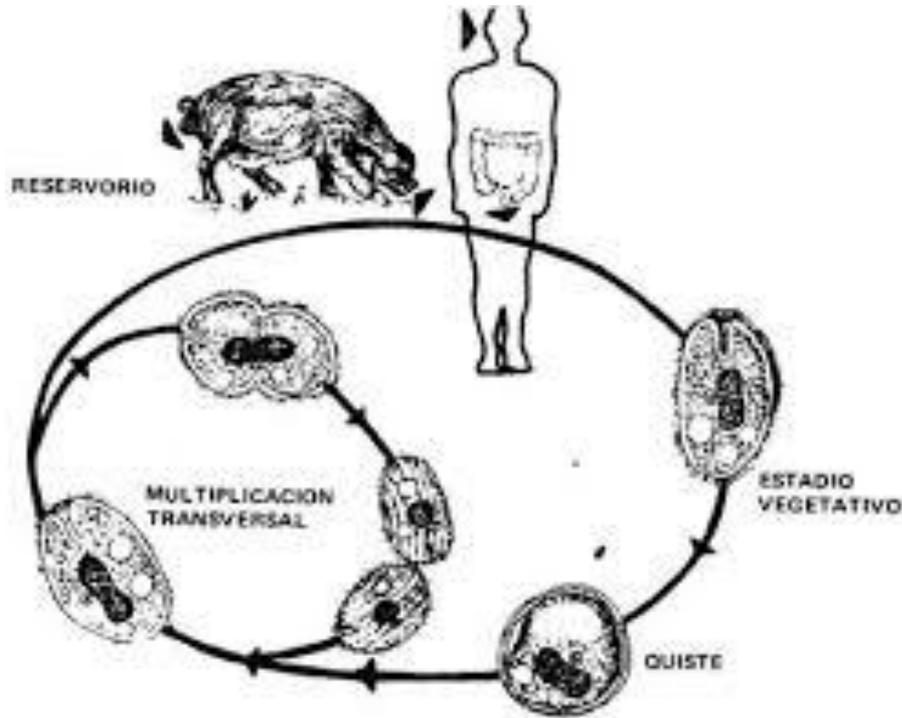


*Development inside parasitophorous vacuole also occurs in *E. hellem* and *E. cuniculi*.



Protozoos parásitos

Balantidium coli

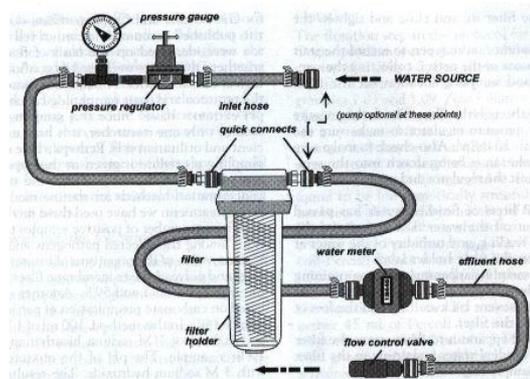


Protozoos parásitos

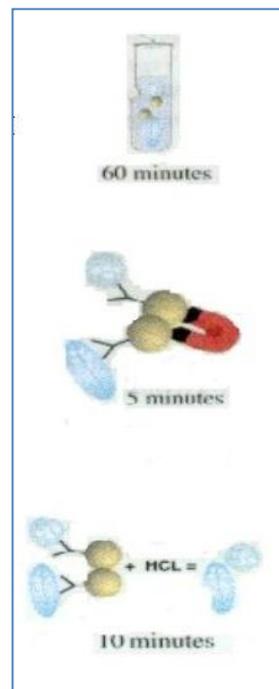
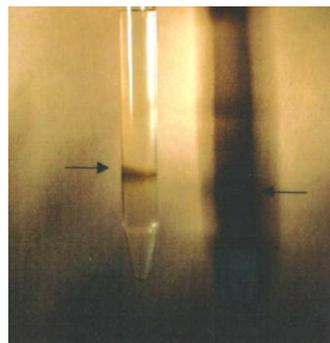
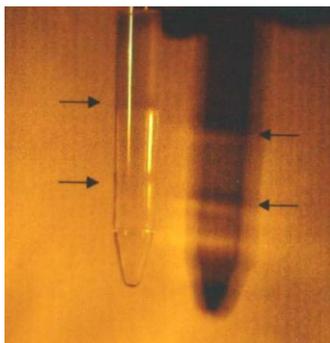
- Tratamiento:
 - Eliminación de partículas:
 - ✓ Coagulación, sedimentación, filtración
 - ✓ Combinación coagulación con filtración (99-99,99%)
 - ✓ Presencia en agua de retrolavado de filtros
 - Desinfección:
 - ✓ Quistes/ooquistes resistentes al cloro y similares
 - ✓ Ozono y Dióxido de cloro efectivos
 - No existe buena correlación con indicadores fecales

	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Protozoos	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-3 log ₁₀	1-4 log ₁₀

Protozoos parásitos

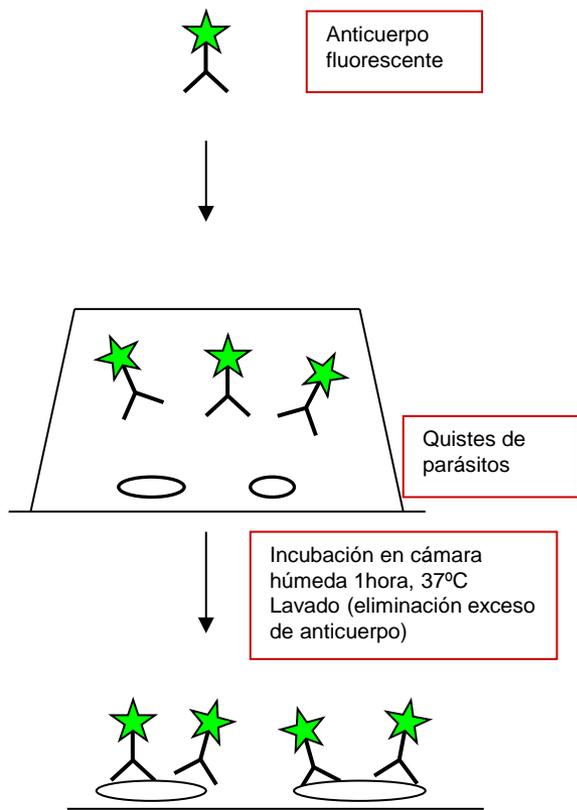


1. Etapa
concentración

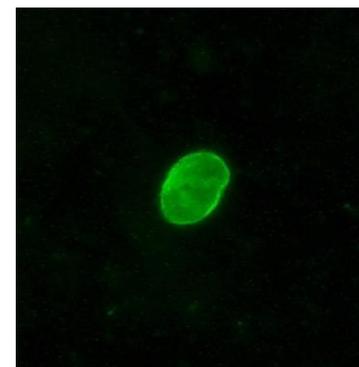
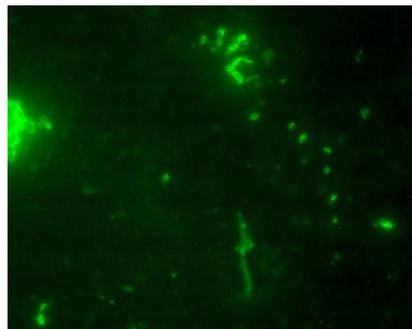


2. Etapa
clarificación

Protozoos parásitos



3. Etapa detección y cuantificación



Helmintos parásitos

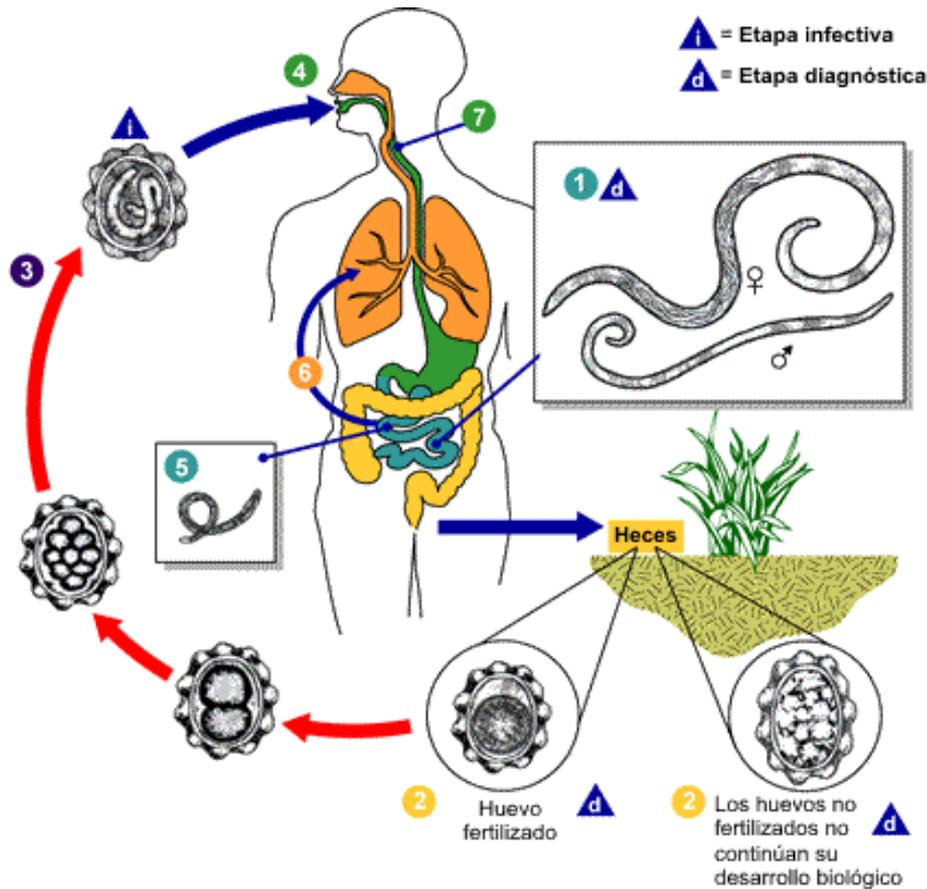
- Animales invertebrados vermiformes
- Presentes en heces humanas y animales
- Características epidemiológicas
 - ✓ Alta persistencia en el ambiente
 - ✓ Baja dosis infectiva
 - ✓ Baja respuesta inmune
 - ✓ Viables en el suelo durante largos periodos de tiempo
- Distintas rutas de transmisión
 - ✓ Ingestión de hospedadores intermediarios
 - ✓ Penetración por la piel y mucosas
 - ✓ Ingestión de verduras regadas con aguas residuales
- Mayores riesgos debido a helmintos que a virus o bacterias
 - ✓ Más resistentes en el ambiente
 - ✓ No suelen desarrollar una inmunidad



Helmintos parásitos

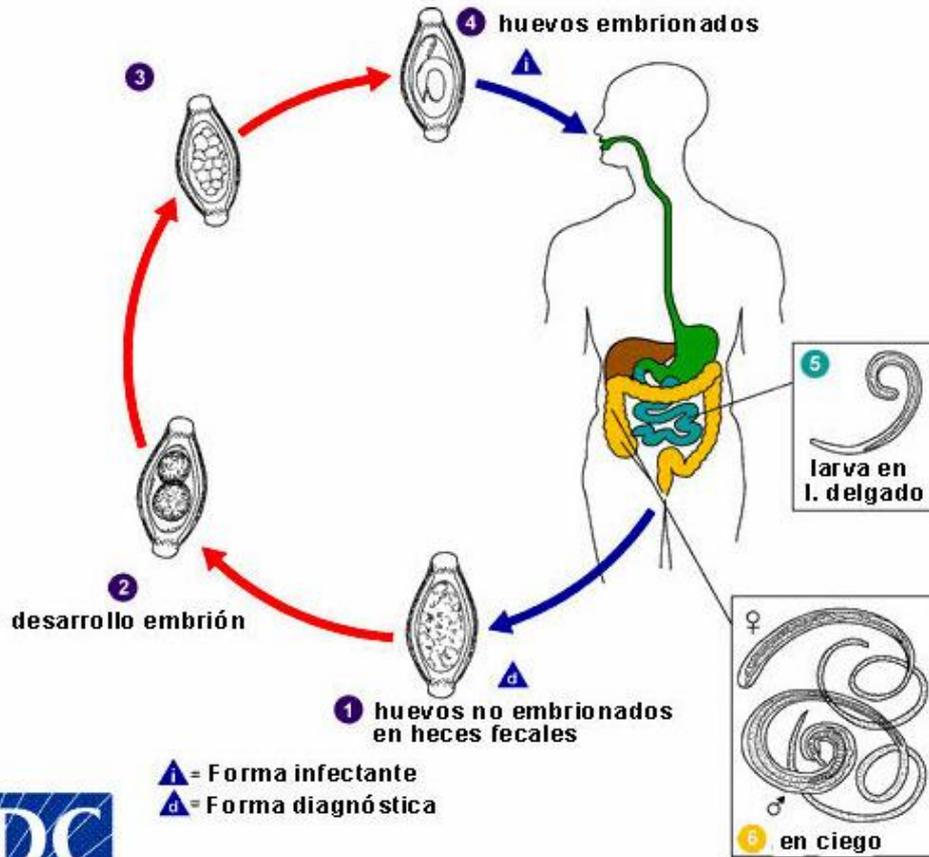
Helmintos	Enfermedad principal	Origen
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	H. humanas/suelo
<i>Ascaris suum</i>	Ascariasis	H. animales/suelo
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anquilostomiasis	H. humanas/animal
<i>Necator americanus</i>	Anquilostomiasis	H. humanas/animal
<i>Trichuris trichiura</i>	Tricurasis	H. humanas/suelo
<i>Taenia saginata</i>	Cisticercosis	Vacas y vegetales/suelo
<i>Taenia solium</i>	Cisticercosis	Cerdos y vegetales/suelo
<i>Schistosoma</i> sp.	Esquistosomiasis	Aguas/ h. intermediarios acuáticos

Helmintos parásitos



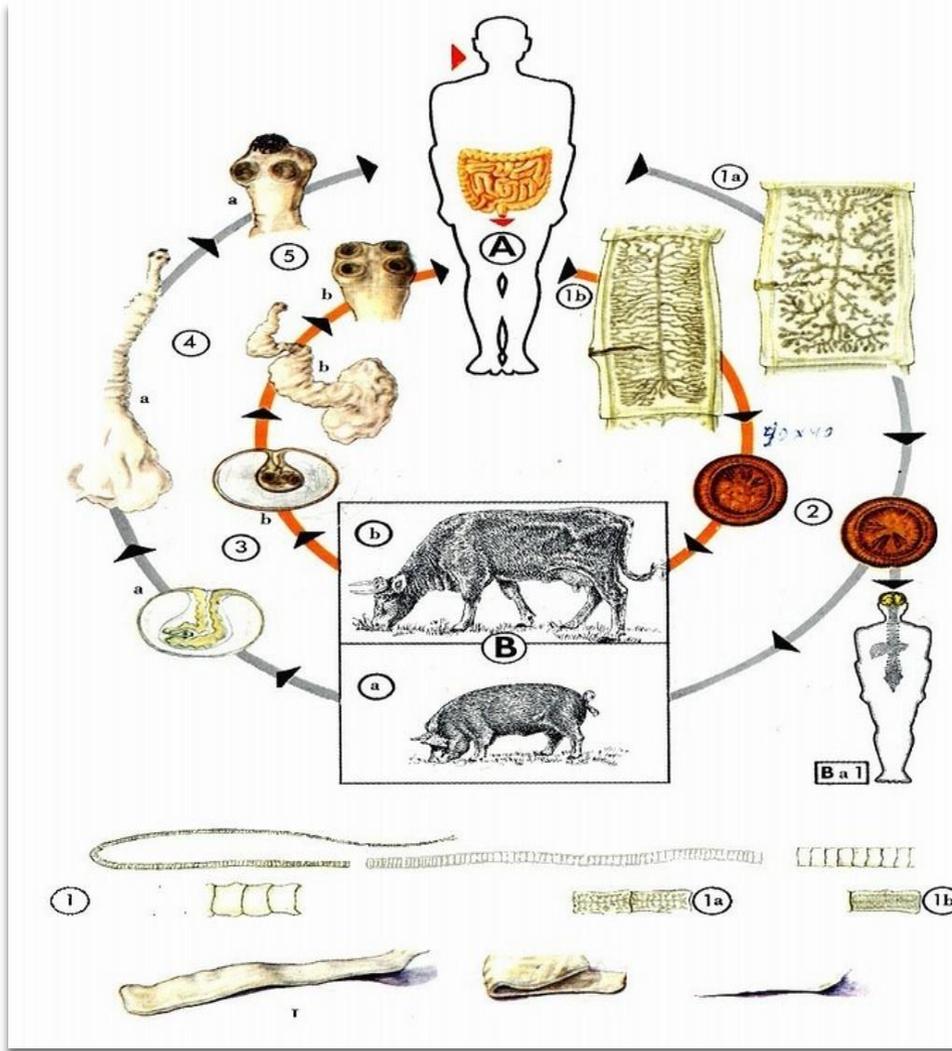
Ascaris sp.

Helmintos parásitos



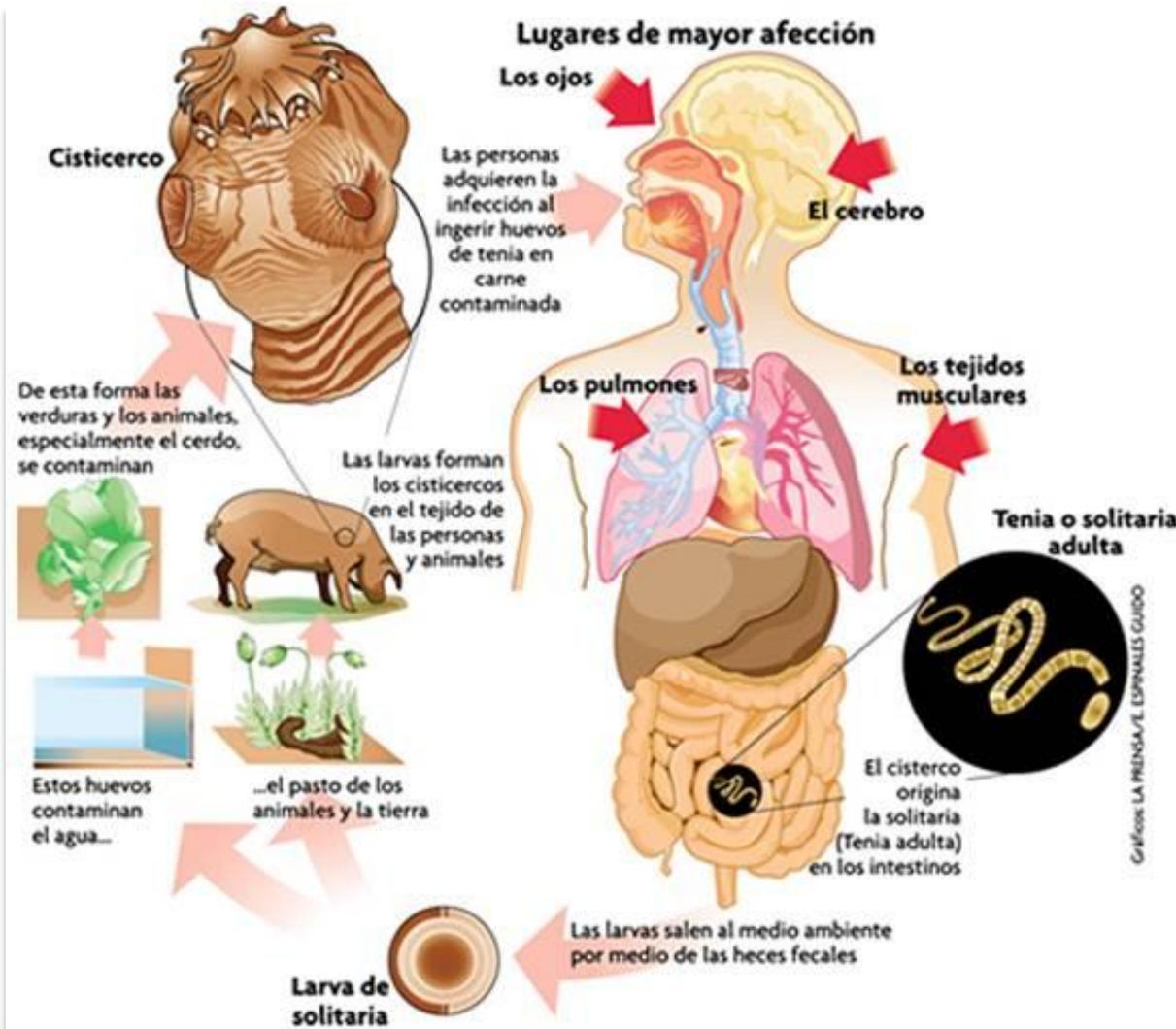
Trichuris trichura

Helmintos parásitos



Taenia saginata/solium

Helmintos parásitos



Taenia saginata/solium



Helmintos parásitos

- Sistema convencional de tratamiento poco eficaz
- Sedimentación / Coagulación
- Filtración
- Lagunaje
- Desinfección poco efectiva
- Inactivación por fotocatalisis homogénea (Co^{2+} y Fe^{2+})

	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Helmintos	0-2 \log_{10}	1-3 \log_{10}	0-2 \log_{10}	0-2 \log_{10}	1-3 \log_{10}	0-1 \log_{10}	1-3 \log_{10}



Helmintos parásitos



1. Etapa concentración



2. Etapa desorción



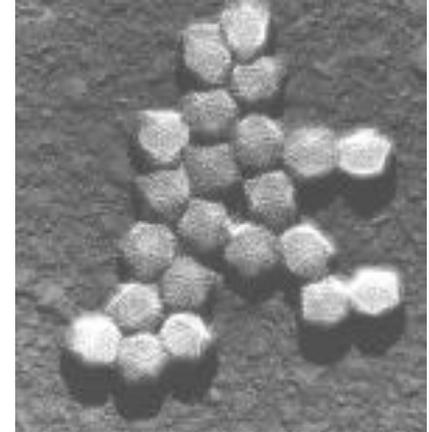
3. Etapa de flotación



4. Etapa de recuento

Virus entéricos

- 140 virus patógenos trasmisibles al hombre
- Multiplicación en el tracto digestivo y eliminados por heces
- Permanecen infectivos en el ambiente (unión a sedimentos)
- Concentración promedio de 10^5 UFP/l
- Patologías más comunes: gastroenteritis y hepatitis
- No generan protección inmunitaria a largo plazo
- Dosis infectivas bajas
- Presencia en el agua depende de factores:
 - ✓ Nivel de higiene de la población
 - ✓ Incidencia de enfermedades en la comunidad
 - ✓ Nivel socioeconómico
 - ✓ Época del año



Virus entéricos

•Estabilidad vírica:

- ✓ Fundamental para la transmisión ambiental
- ✓ Limita periodo capaz de mantener la viabilidad
- ✓ Directrices para eliminar contaminación vírica
- ✓ Características:
 - ARN: lábil, dañado a pH ácidos y básicos, por radiación y enzimas
 - DNA: más estable, pero sensible a UV
 - Proteínas víricas: protección fundamental
- ✓ Poblaciones remanentes de virus resistentes a la eliminación
- ✓ Persistencia en materia seca variable
 - Depende de la humedad y materia fecal presente
- ✓ Persistencia en aguas
 - Enterovirus: 14-288 h
 - >1 año rotavirus y poliovirus; 300 d para AdV 41

Virus entéricos

- Indicadores bacterianos inadecuados
- Identificación y enumeración complejas y costosas
 - ✓ Cultivos virales (14 días para identificación)
 - ✓ Biología molecular
 - ✓ Real time PCR
- Resistencia al cloro
- Sensibilidad a UV
- Combinación de procesos



	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Virus	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	1-2 log ₁₀	0-4 log ₁₀	1-4 log ₁₀



Virus entéricos

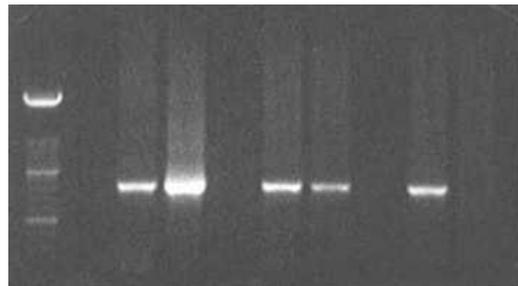
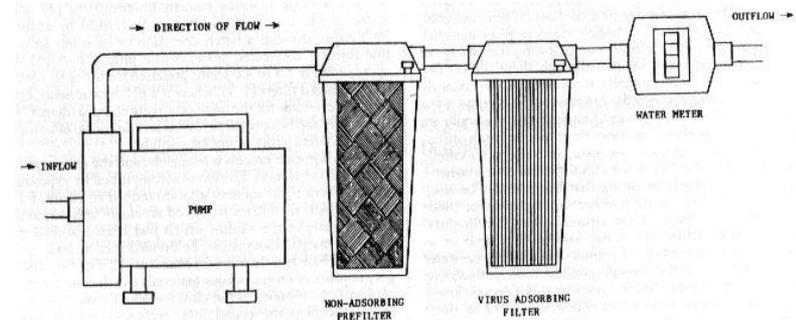
Virus entéricos	Enfermedad principal	Origen
Poliovirus	Poliomielitis	H. humanas
Coxsackievirus	Enf. aparato resp. superior	H. humanas
Echovirus	Enf. aparato resp. superior	H. humanas
Rotavirus	Gastroenteritis	H. humanas
Norovirus/Sappovirus	Gastroenteritis	H. humanas
Virus hepatitis A	Hepatitis infecciosa	H. humanas
Virus hepatitis E	Hepatitis	H. humanas
Astrovirus	Gastroenteritis	H. humanas
Adenovirus entérico	Gastroenteritis	H. humanas

Virus entéricos

- Virus emergentes:
 - **Hepatitis E:**
 - ✓ ARN con 4 genotipos (Europa: genotipo III)
 - ✓ Reservorio animal: cerdos (rata, gato..)
 - ✓ Cepas porcinas en aguas residuales y muestras clínicas
 - ✓ Inactivación 90 % en AARR 20 días (20°C)
 - ✓ 53,8% en muestras de AARR (20 secuencias distintas)
 - ✓ Grupos de riesgos: trabajadores expuestos a aerosoles y animales
 - **Poliomavirus humanos (JC,BK):**
 - ADN circular
 - Infección a amplia variedad de animales
 - Patologías SNC, nefropatía, cistitis hemorrágica
 - Excreción en orina (infecciones renales persistentes)
 - JC: 98% muestras AARR (10^2 - 10^3 /mL)
 - BK: 90% muestras AARR (10 - 10^2 /mL)
 - Estables en AARR

Virus entéricos

1. Fase de concentración
 - Filtración mediante filtros cargados
 - Filtración membranas cargadas
2. Fase de elución
 - Cambio de cargas de los filtros
3. Cuantificación:
 - Cultivos celulares (recuento de calvas)
4. Identificación mediante BM (PCR o RT-PCR)



Características epidemiológicas

Patógeno	Resistencia en el medio	Dosis infectiva mínima	Inmunidad	Vías de contaminación	Estados de latencia en el suelo
Virus	Medio	Baja	Corta/Media	Aguas y alimentos	No
Bacterias	Corta/media	Media/alta	Corta/Media	Aguas y alimentos	No
Protozoos	Larga	Baja/Media	Ninguna/Poca	Aguas y alimentos	No
Helmintos	Larga	Baja	Ninguna/Poca	Aguas y alimentos	Si

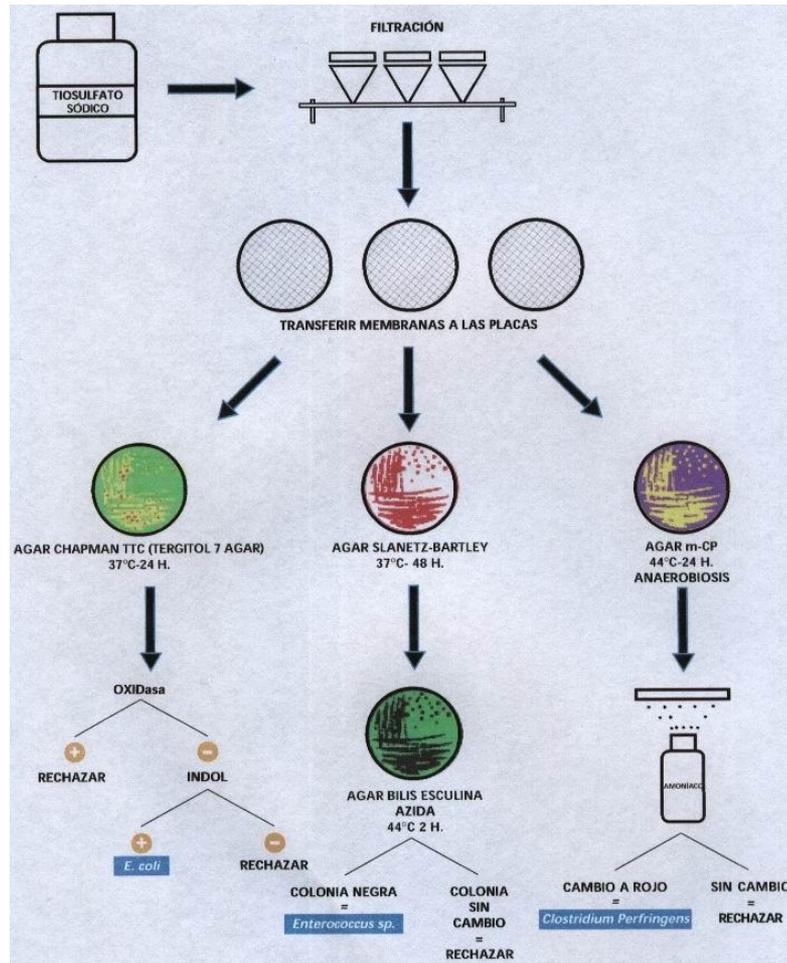
Organismos indicadores de contaminación fecal

- Dificultad en monitorizar los patógenos del agua
 - ✓ Aislamiento e identificación laboriosos
 - ✓ Gran volumen de muestra (bajo nº de patógenos)
 - ✓ Se han definido indicadores para calidad del agua
- Características de un indicador ideal:
 - ✓ Relación indicador/patógeno elevada
 - ✓ Presencia abundante en materia fecal
 - ✓ Respuesta similar a la del patógeno
 - ✓ Detección sencilla y barata con resultados precisos
 - ✓ Estable y no patógeno
 - ✓ Adecuado a todos los tipos de aguas

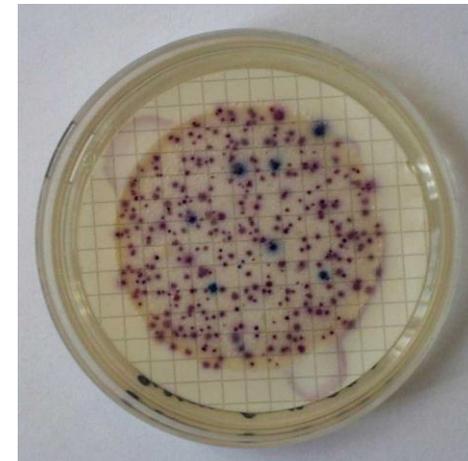
Organismos indicadores de contaminación fecal

- No existe un único organismo
- Más habituales:
 - ✓ *E. coli* (RD 1620/2007)
 - ✓ Enterococos
 - ✓ *Clostridium perfringens*
 - Indicador de quistes/ooquistes
 - Modelo en ensayos de supervivencia y desinfección
- Otros:
 - *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*
 - *Aeromonas hydrophila*
 - *Bifidobacterium* y *Bacteroides fragilis* (origen de la contaminación)
 - *Pseudomonas*
- Identificación y enumeración de virus compleja y de alto coste
- Biología molecular para detección vírica (no infectividad)

Organismos indicadores de contaminación fecal



Método de filtración por membrana

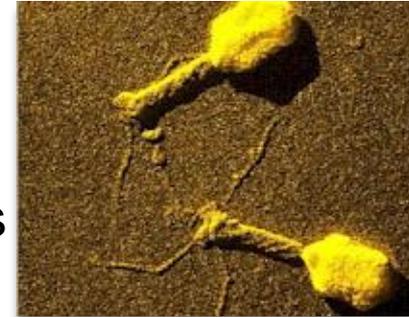


Organismos indicadores de contaminación fecal

• Indicadores víricos:

✓ Primer indicador: Poliovirus

- Cantidades muy variables en ambientes acuáticos
- Laboratorios especializados
- Obtención de resultados después de varios días



✓ Indicadores propuestos: Bacteriofagos

- Presencia abundante en aguas residuales y contaminadas
- Poblaciones de colifagos mayores que las de los enterovirus
- Incapacidad de multiplicación fuera del hospedador bacteriano
- Aislamiento y enumeración con métodos sencillos
- Resultados rápidos
- Resistencia similar a enterovirus frente a la desinfección

Organismos indicadores de contaminación fecal

• Indicadores víricos:

✓ Colifagos somáticos

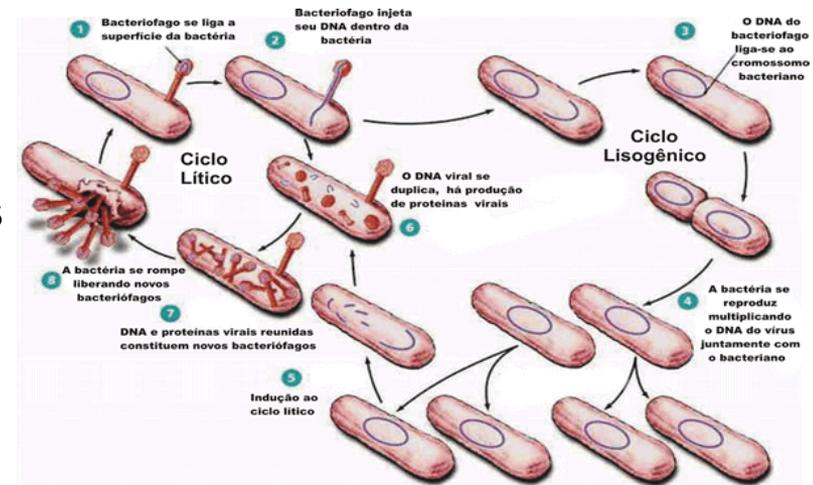
- *E. coli*: adsorción somática
- Heces animales y humanas
- 10^4 - 10^6 UFP/100 ml
- Presencia en aguas no contaminadas

✓ Bacteriofagos F-RNA específicos

- Adsorción a través del pili sexual
- Heces animales y humanas
- 10^3 - 10^5 UFP/100 ml
- Bajo recrecimiento

✓ Bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis*

- Asilamiento sólo en aguas contaminadas (menos abundantes)
- Sin capacidad de recrecimiento
- Métodos más complejos
- Disminuyen en la misma proporción que poliovirus y rotavirus

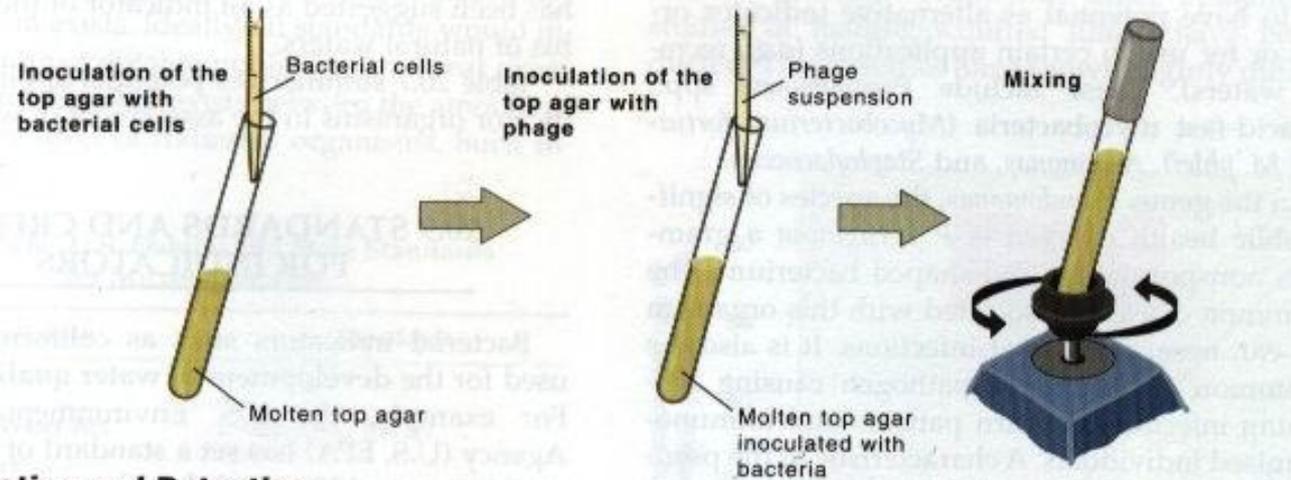


Organismos indicadores de contaminación fecal

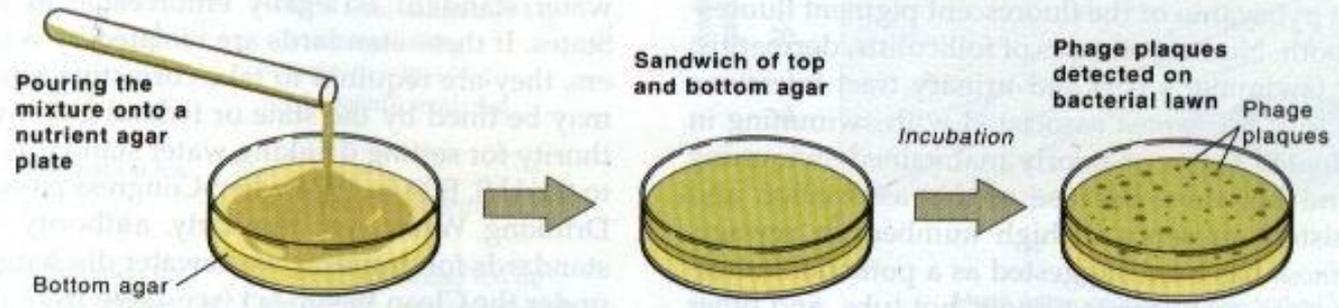
Bacteriófagos:



a) Preparation of the Top Agar



b) Plating and Detection



Organismos indicadores de contaminación fecal

- Indicador de huevos de helmintos:

- ✓ *Ascaris lumbricoides* (en estudios ambientales):

- Larga persistencia en el suelo
 - No se multiplica
 - Fácil identificación
 - Nivel de parasitismo a nivel mundial alto
 - Enfermedad leve
 - Infecciones sintomáticas en un 85%
 - Dosis infectiva baja
 - Riesgo de transmisión elevado (gran cantidad de huevos)



Técnicas de Biología Molecular

✓PCR:

- Amplificación de un gen o un fragmento específico
- Ingredientes necesarios para la reacción:
 - ✓ dNTPs
 - ✓ Buffer de PCR
 - ✓ MgCl₂
 - ✓ Primers o cebadores
 - ✓ Agua
 - ✓ Polimerasa
- Requisitos para un buen funcionamiento:
 - ✓ Primers
 - ✓ Concentración de MgCl₂
 - ✓ T_m adecuada

• Inconvenientes:

- ✓ Equipamiento
- ✓ Personal cualificado
- ✓ Inhibidores: Falsos negativos
- ✓ Protocolos no estandarizados

• Ventajas:

- ✓ Rapidez
- ✓ Sensibilidad y especificidad
- ✓ Detección de viables no cultivables

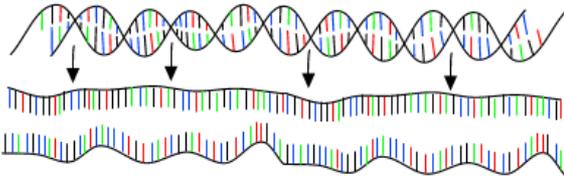
Técnicas de Biología Molecular

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

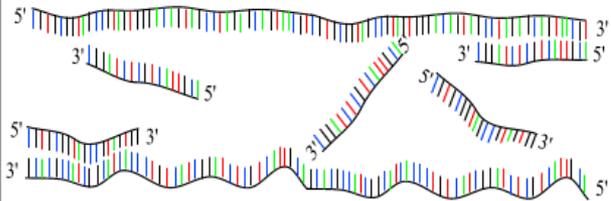
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

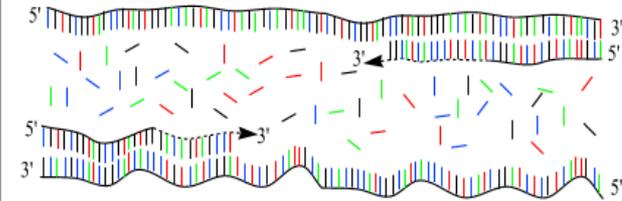
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

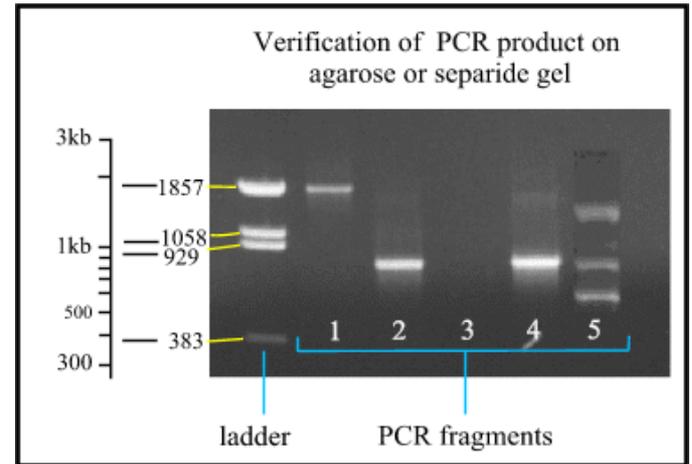
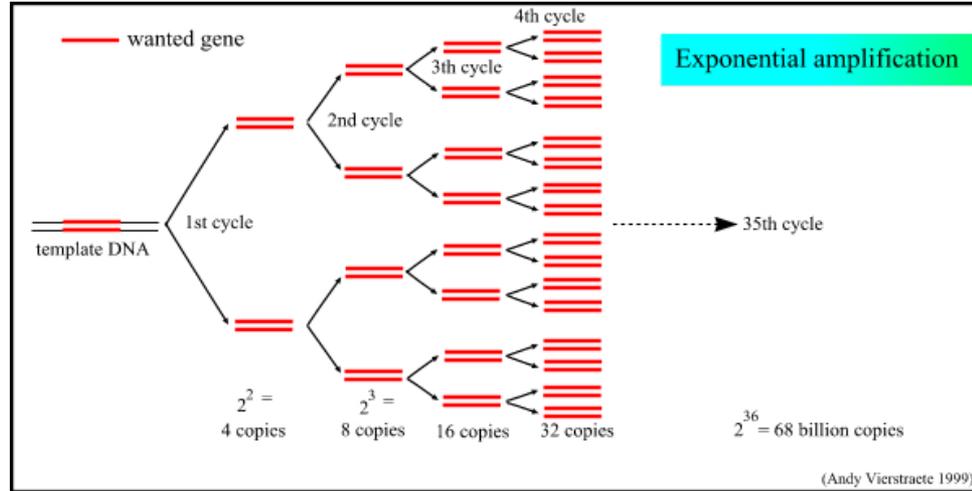


Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)



Técnicas de Biología Molecular

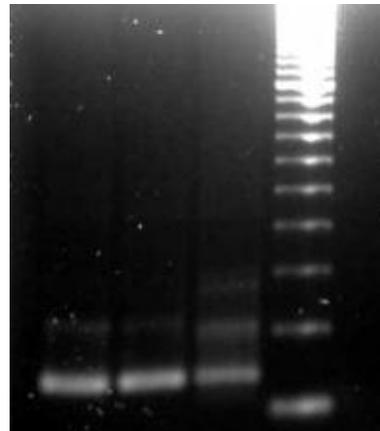
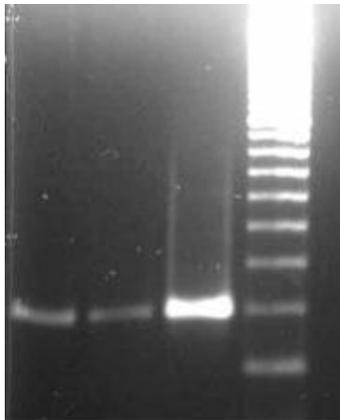
✓ Nested-PCR:

✓ Empleo en:

- ✓ Amplificación de fragmentos no específicos
- ✓ Amplificación de fragmentos de microorganismos emparentados
- ✓ Poca cantidad de material de partida

✓ 2ª PCR partiendo del amplificado de la 1ª PCR

✓ Utilización de cebadores internos



• Inconvenientes:

- ✓ Peligro de contaminación

• Ventajas:

- ✓ Aumento de sensibilidad
- ✓ Aumento de la especificidad

Técnicas de Biología Molecular

✓RT-PCR:

- Genoma de muchos virus de transmisión hídrica constituido por RNA
- Viabilidad de microorganismos
- Componentes similares a la PCR
- Retrotranscriptasa (MMLV-II)

RNA monocatenario  cDNA bicatenario

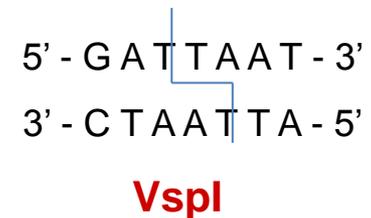
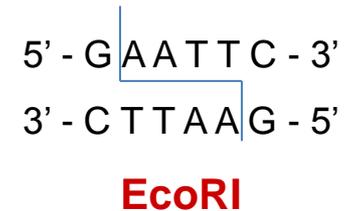
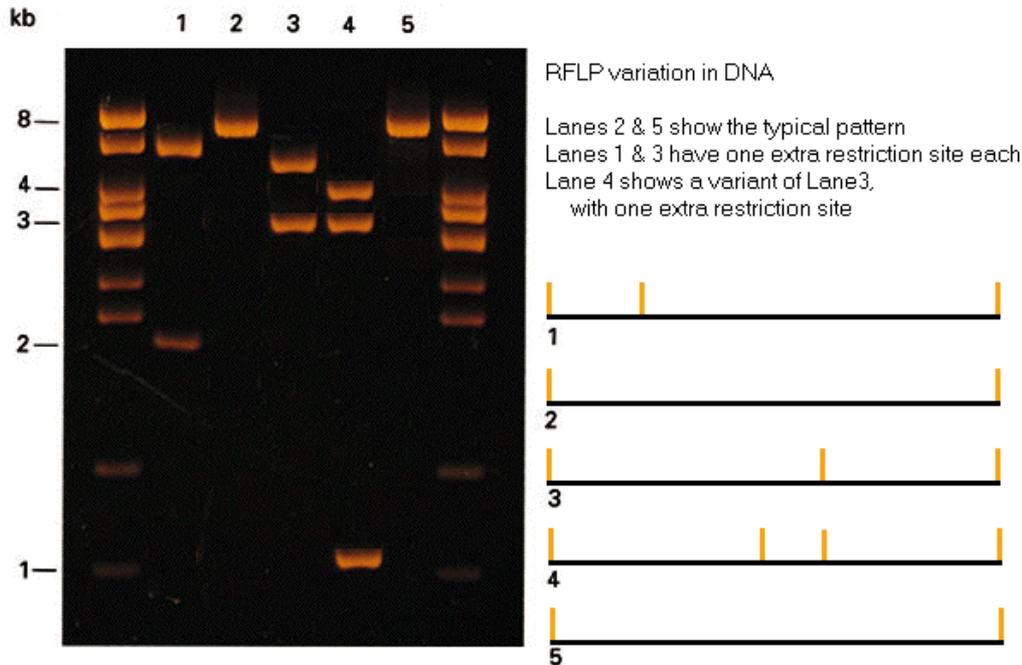
➤ Fases:

- ✓ Transcripción reversa: unión del primer a la secuencia de RNA objetivo y extensión del mismo por acción de la RT
- ✓ Obtención de cDNA tras finalizar la RT
- ✓ Inicio de la PCR

Técnicas de Biología Molecular

✓ Análisis de fragmentos de restricción (PCR-RFLP):

- Amplificación de un fragmento específico
- Digestión con enzimas de restricción
- Producción de un patrón de bandas característico



Técnicas de Biología Molecular

✓ PCR a tiempo real:

PCR estándar



- ✓ Análisis de pto. final
- ✓ Detección del producto por electroforesis

PCR Tiempo Real



- ✓ Análisis de la cinética de la reacción
- ✓ Detección del producto en cada ciclo

Detección del producto en cada ciclo:

✓ Compuestos fluorescentes:

- Emiten fluorescencia cuando se unen a dsDNA
- Interacción inespecífica
- Sybr Green
- Puede unirse a dímeros

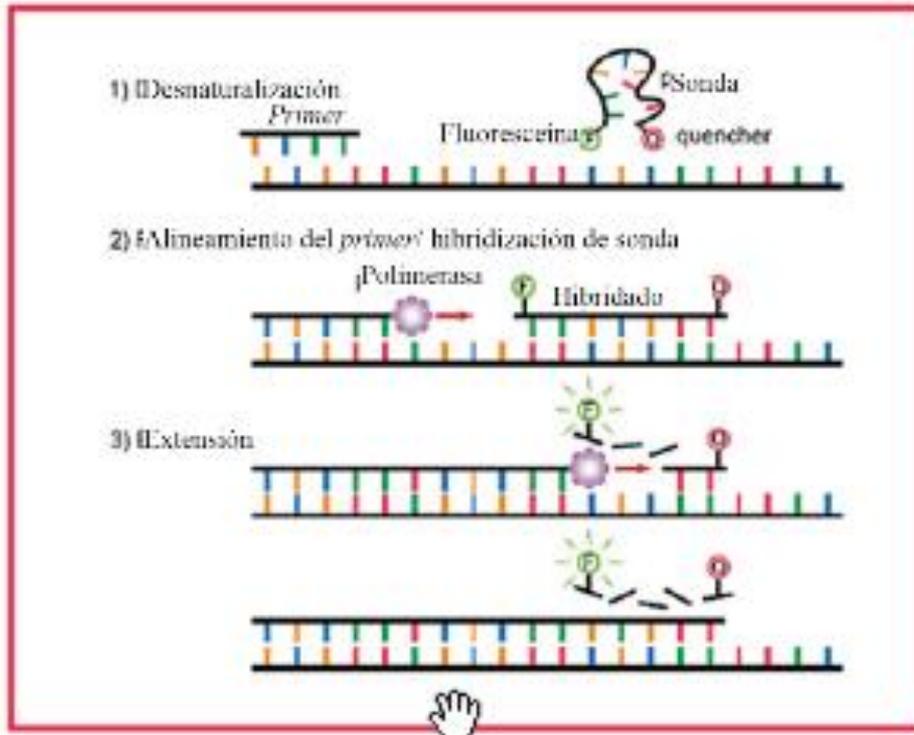
✓ Sondas fluorescentes:

- Sondas Taqman

Técnicas de Biología Molecular

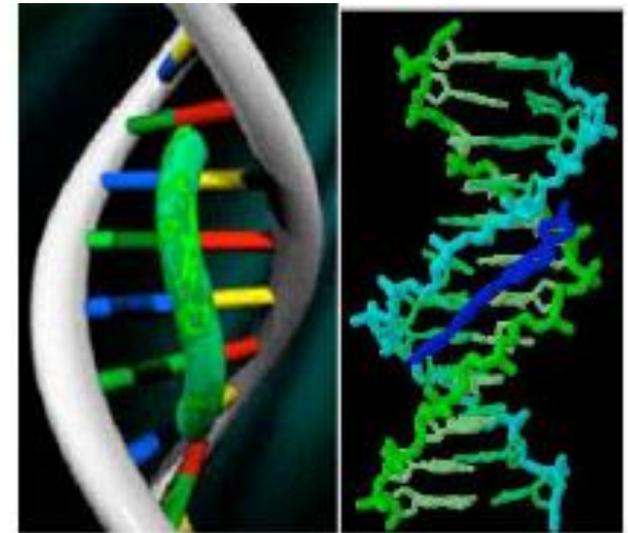
✓ PCR a tiempo real:

TaqMan PCR:



SYBR Green:

- Absorbe a 480 nm
- Emite a 520 nm
- Desventaja: Unión a cualquier DNA de doble cadena

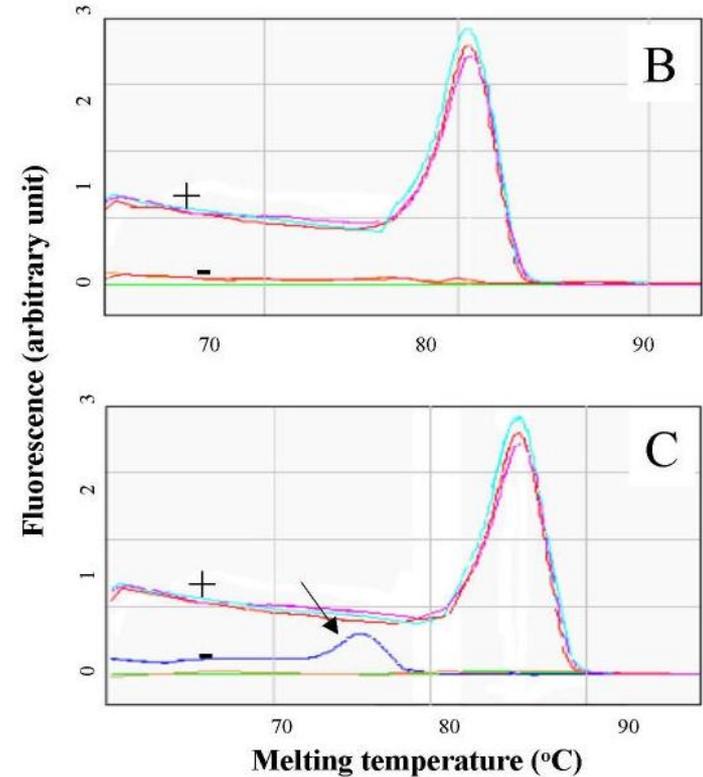


Técnicas de Biología Molecular

✓ PCR a tiempo real:

✓ Ventajas:

- Simple y rápida (semi-automatizada)
- No hay manipulación post-PCR
(disminución de contaminación)
- Cuantificación del ADN o ARN inicial
- Alta sensibilidad y especificidad
- Discriminación de productos inespecíficos
(análisis de T^a fusión)
- Detección de más de un producto específico en una reacción



REFORÇO DAS CAPACIDADES E COMPETÊNCIAS RELATIVAS A GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS NAS ILHAS



ISLHÁGUA

PROJECTO COFINANCIADO POR:



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



www.islhagua.org