

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 aguas residuales y regeneradas

Gran Canaria, 23 de Octubre 2013

Néstor Abreu Acosta

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Microorganismos patógenos:
 - Bacterias patógenas
 - Protozoos y helmintos parásitos
 - Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR

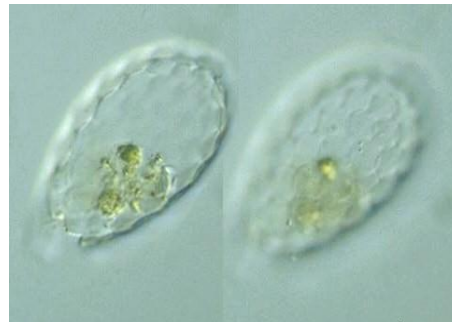
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

Componentes biológicos

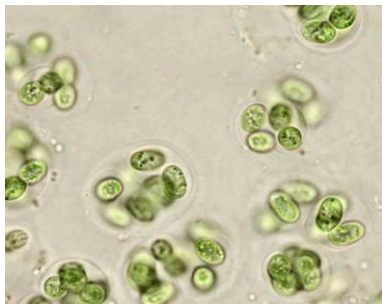
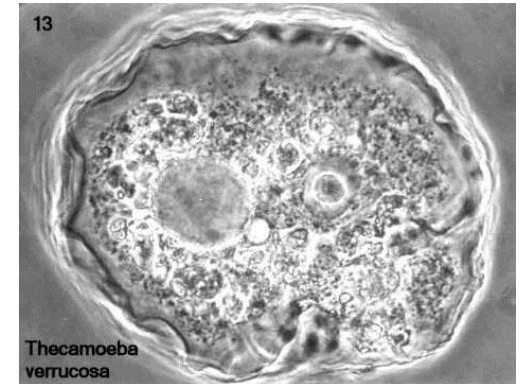
- Medio rico en microorganismos autóctonos o alóctonos
 - Amebas, cianobacterias, algas



Chroococcus



Euglypa tuberculata



Gloeocapsa



Diatoma

Componentes biológicos

- Ciliados



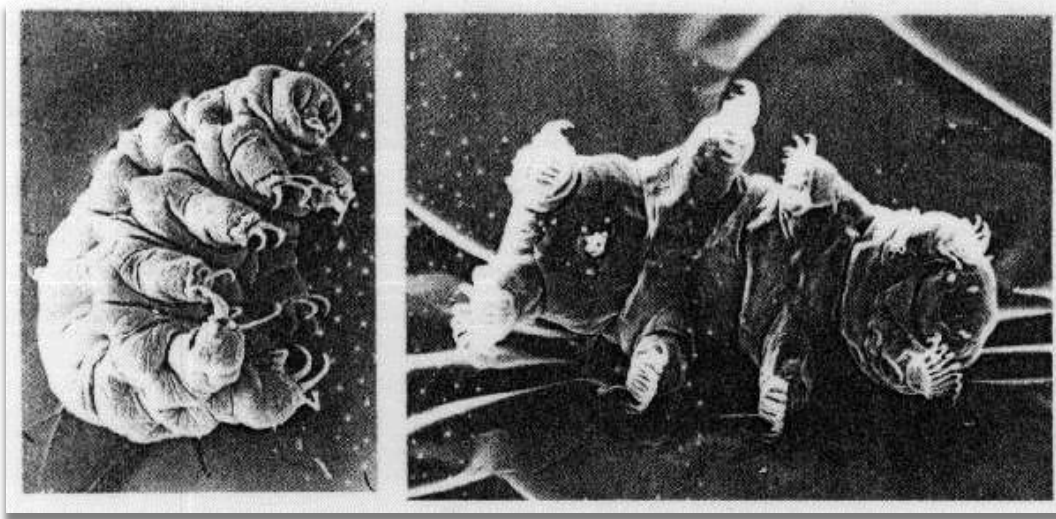
Componentes biológicos

- Invertebrados



Componentes biológicos de las aguas depuradas y regeneradas

- Invertebrados



Componentes biológicos

- 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

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}

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

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)

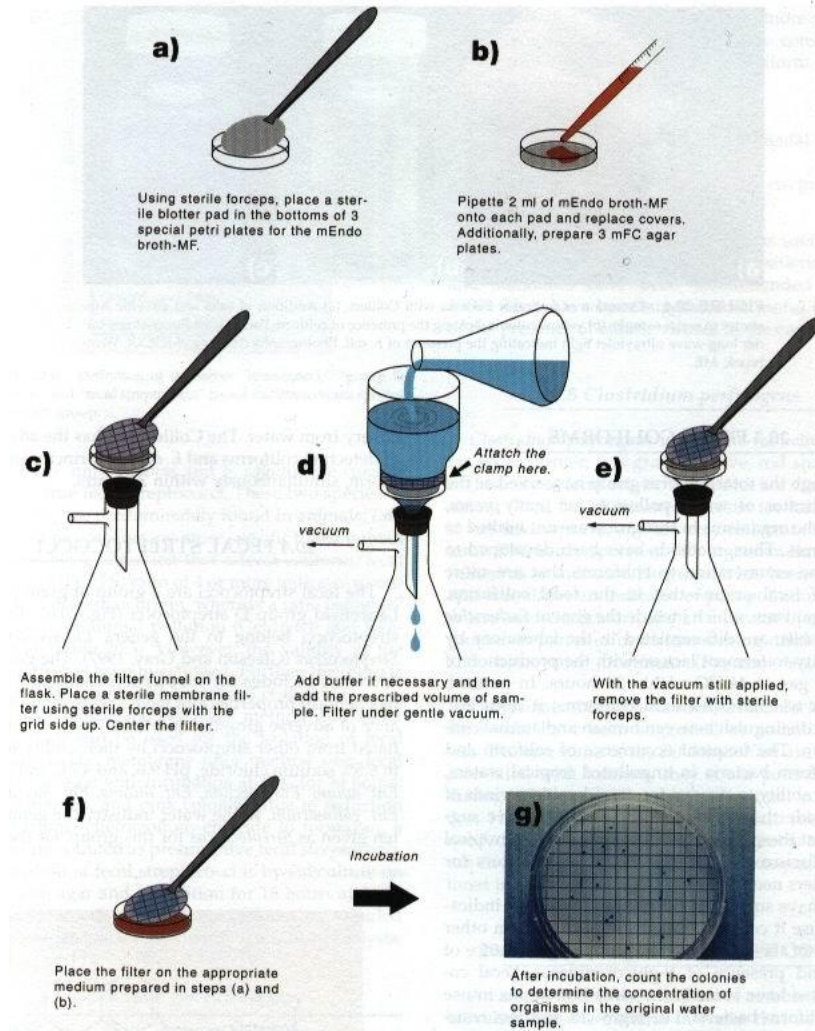


E. coli

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



Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

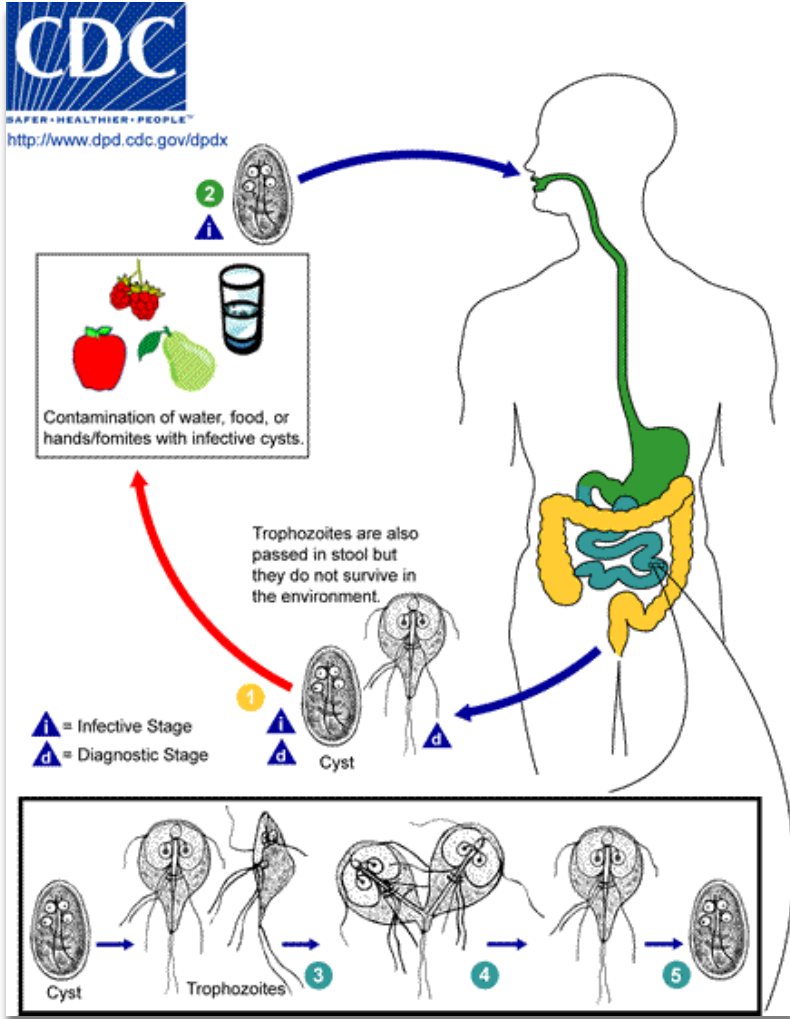
Protozoos parásitos

- 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

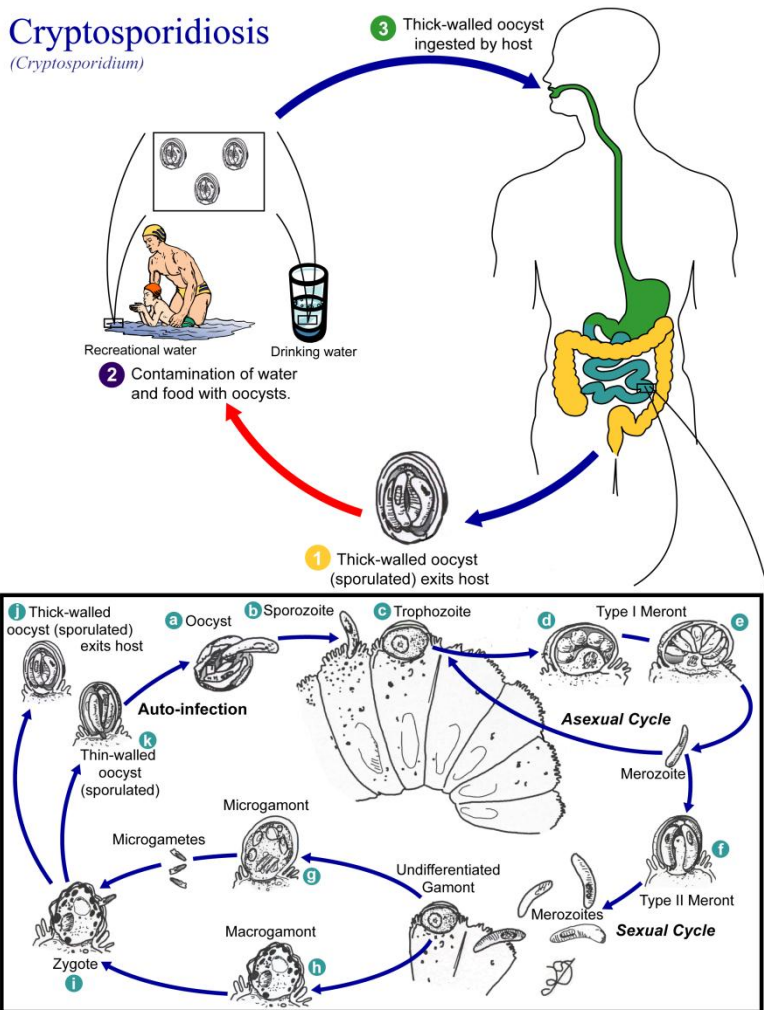
• Características biológicas para la transmisión hídrica:

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



Protozoos parásitos

Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium*)



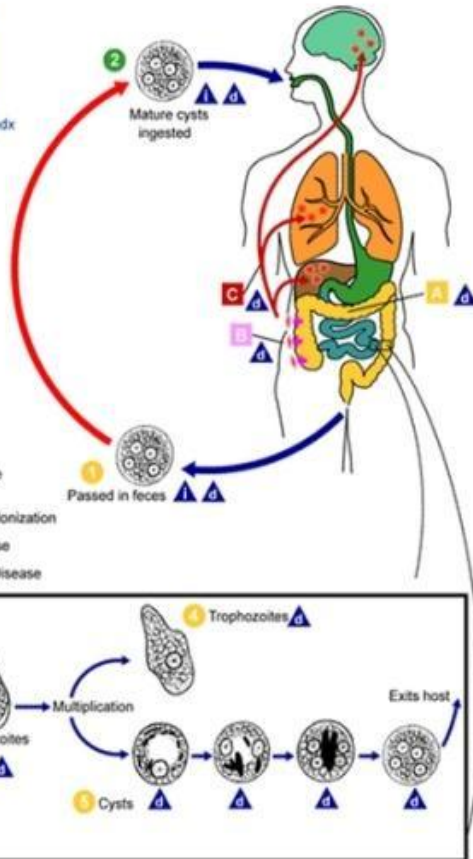
Cryptosporidium sp.

• Características biológicas para la transmisión hídrica:

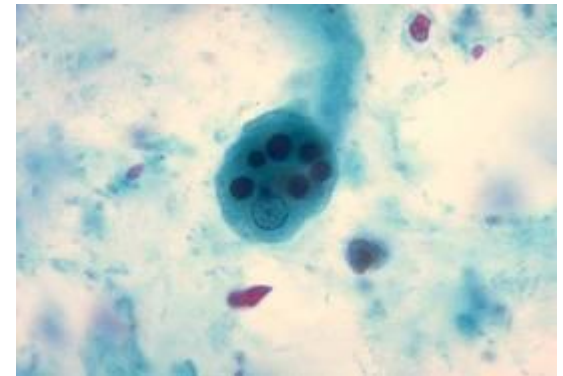
- ✓ Gran excreción de ooquistes
- ✓ Especificidad baja (muchos reservorios)
- ✓ Ooquistes muy robustos
 - Viables más de 6 meses
 - Resistentes a los desinfectantes
- ✓ Pequeño tamaño
- ✓ Baja dosis infectiva



Protozoos parásitos



Entamoeba histolytica

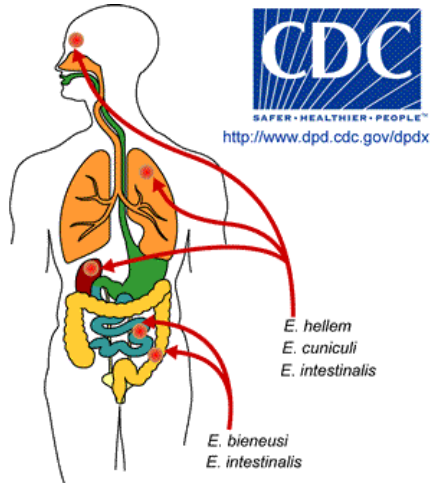


135

(c) 2008, Jeffrey Griffiths, MD, MPH

Protozoos parásitos

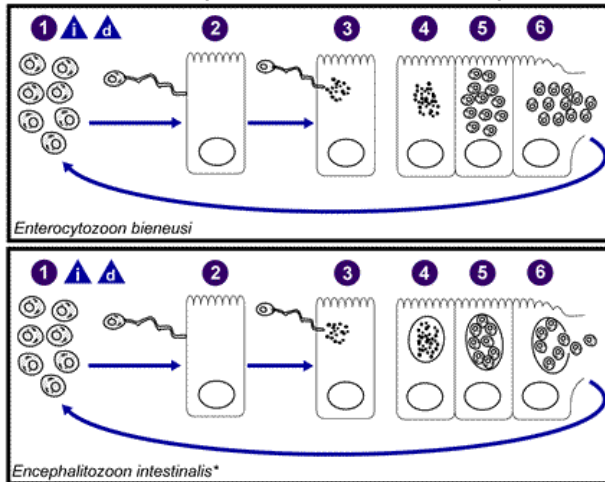
▲ = Infective Stage
 ▲ = Diagnostic Stage



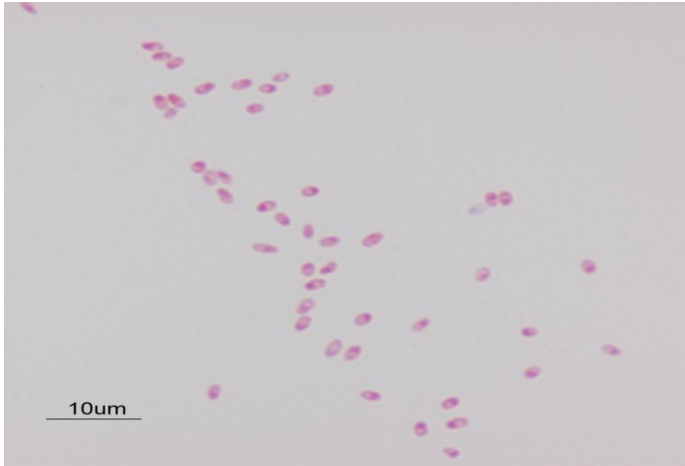
Microsporidios



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



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

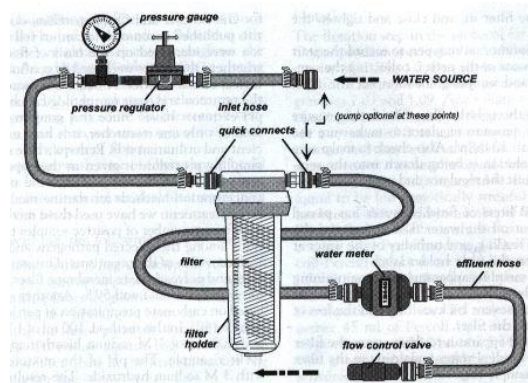


Protozoos parásitos

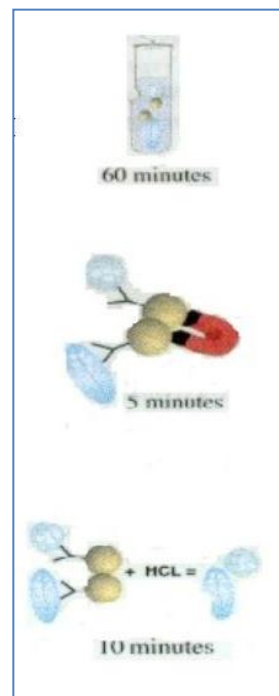
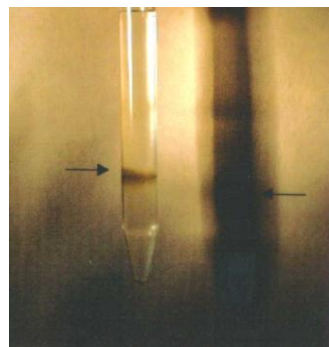
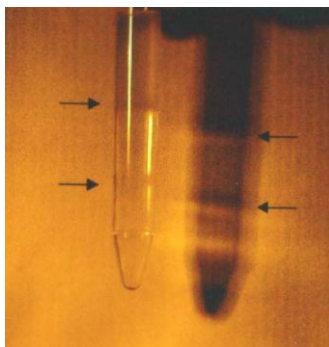
- Tratamiento:
 - Eliminación de partículas:
 - ✓ Coagulación, sedimentación, filtración
 - ✓ Combinación coagulación con filtración (99-99,99%)
 - ✓ Presencia en agua de retrolavado de filtros
 - Desinfección:
 - ✓ Quistes/ooquistes resistentes al cloro y similares
 - ✓ Ozono y Dióxido de cloro efectivos
 - 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

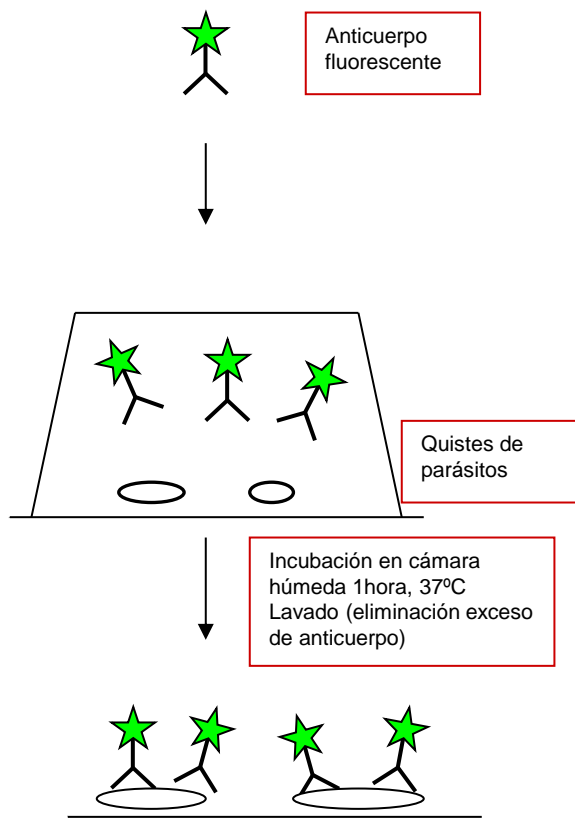


1. Etapa
concentración

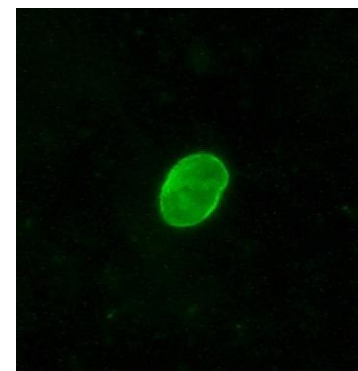
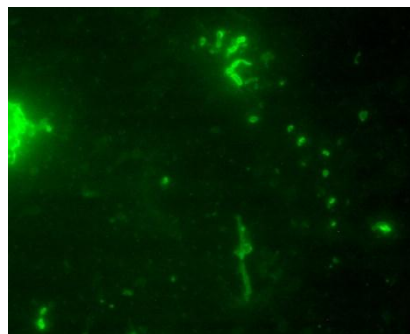


2. Etapa
clarificación

Protozoos parásitos



3. Etapa detección y cuantificación



Helmintos parásitos

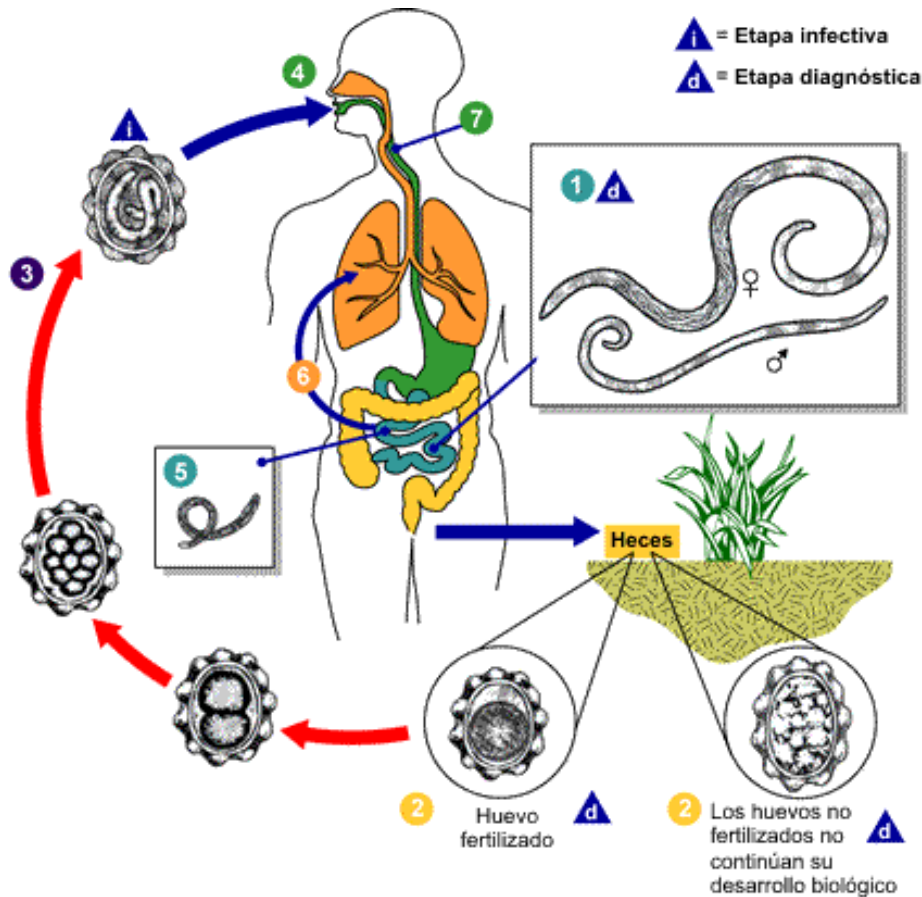
- Animales invertebrados vermiformes
- Presentes en heces humanas y animales
- Características epidemiológicas
 - ✓ Alta persistencia en el ambiente
 - ✓ Baja dosis infectiva
 - ✓ Baja respuesta inmune
 - ✓ Viables en el suelo durante largos periodos de tiempo
- Distintas rutas de transmisión
 - ✓ Ingestión 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

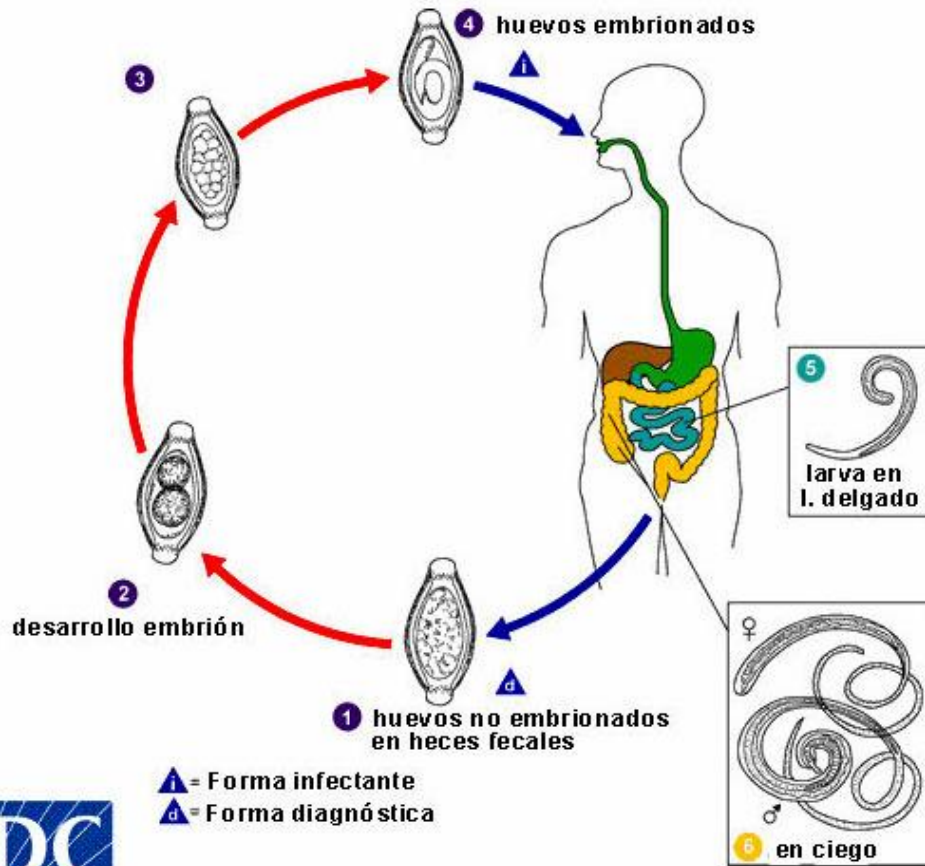
Helmintos	Enfermedad principal	Origen
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	H. humanas/suelo
<i>Ascaris suum</i>	Ascariasis	H. animales/suelo
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anquilostomiasis	H. humanas/animal
<i>Necator americanus</i>	Anquilostomiasis	H. humanas/animal
<i>Trichuris trichiura</i>	Tricurasis	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.

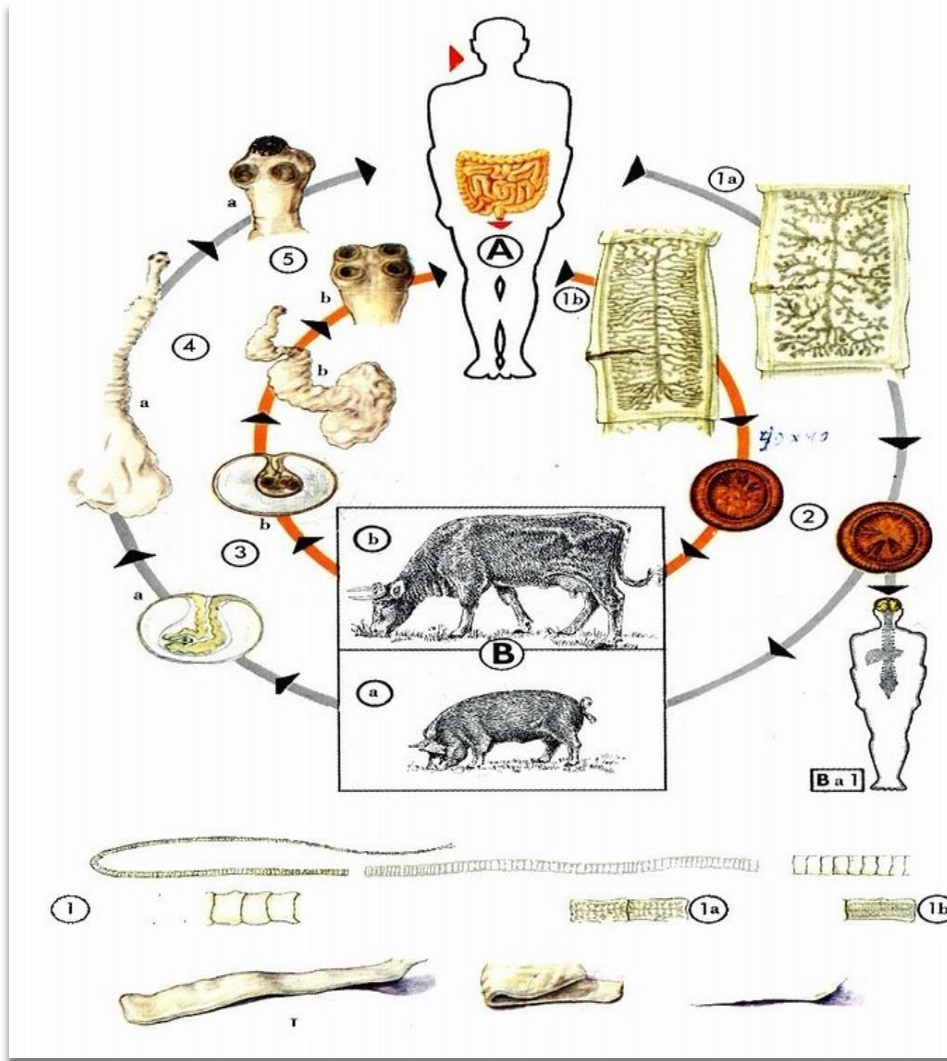
Helmintos parásitos



Trichuris trichura



Helmintos parásitos



Taenia saginata/solium



Helmintos parásitos

- Sistema convencional de tratamiento poco eficaz
- Sedimentación / Coagulación
- Filtración
- 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}

SISTEMA HYDROTECH DISCFILTER



Helmintos parásitos



1. *Etapa concentración*



2. *Etapa desorción*



3. *Etapa de flotación*



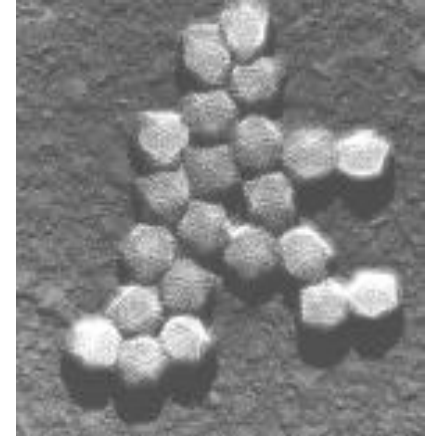
4. *Etapa de recuento*

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

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

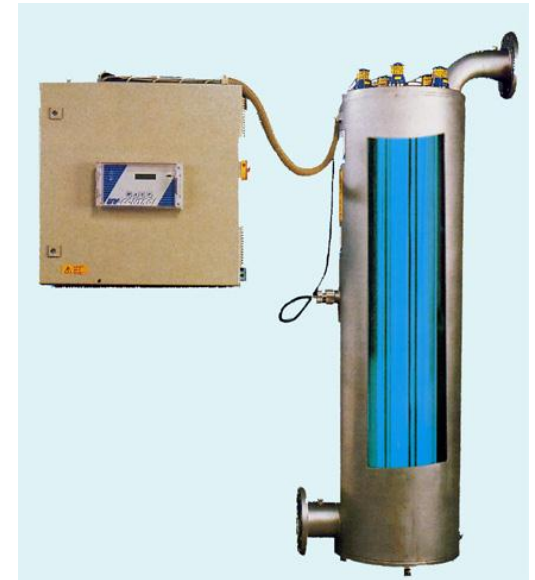
•Estabilidad vírica:

- ✓ 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

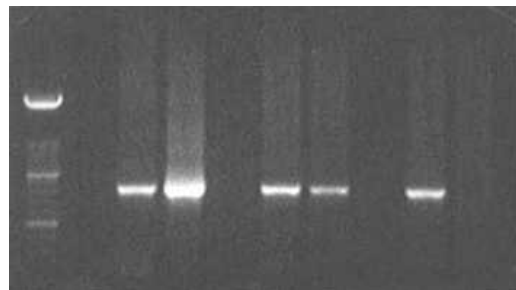
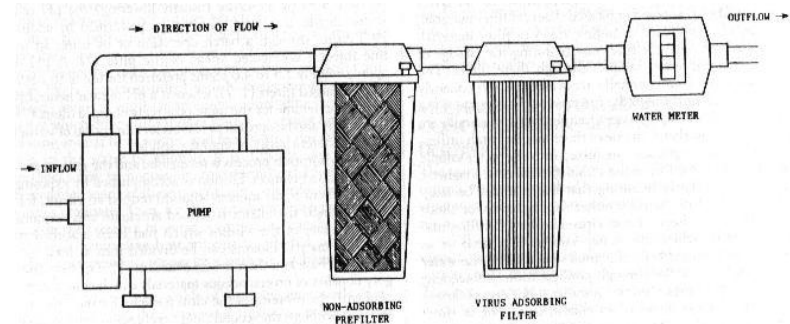
Virus entéricos	Enfermedad principal	Origen
Poliovirus	Poliomielitis	H. humanas
Coxsackievirus	Enf. aparato resp. superior	H. humanas
Echovirus	Enf. aparato resp. superior	H. humanas
Rotavirus	Gastroenteritis	H. humanas
Norovirus/Sappovirus	Gastroenteritis	H. humanas
Virus hepatitis A	Hepatitis infecciosa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



Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

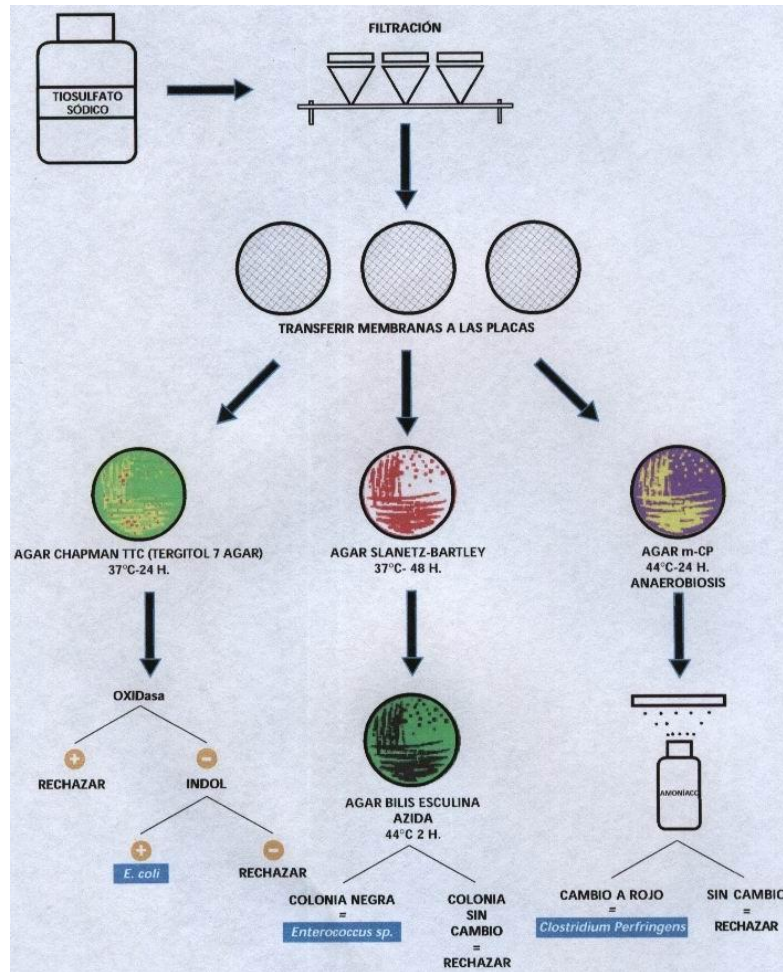
Organismos indicadores de contaminación fecal

- 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

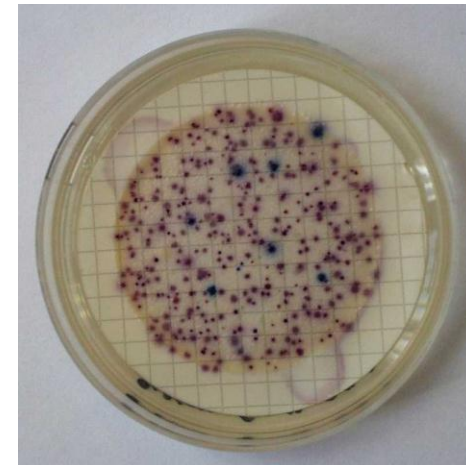
Organismos indicadores de contaminación fecal

- 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

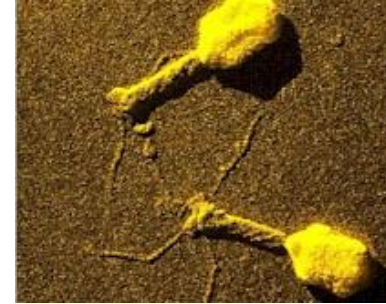


Organismos indicadores de contaminación fecal

• 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 (fuente pobre)
- 10^3 - 10^5 UFP/100 ml
- Bajo recrecimiento

✓ Bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis*

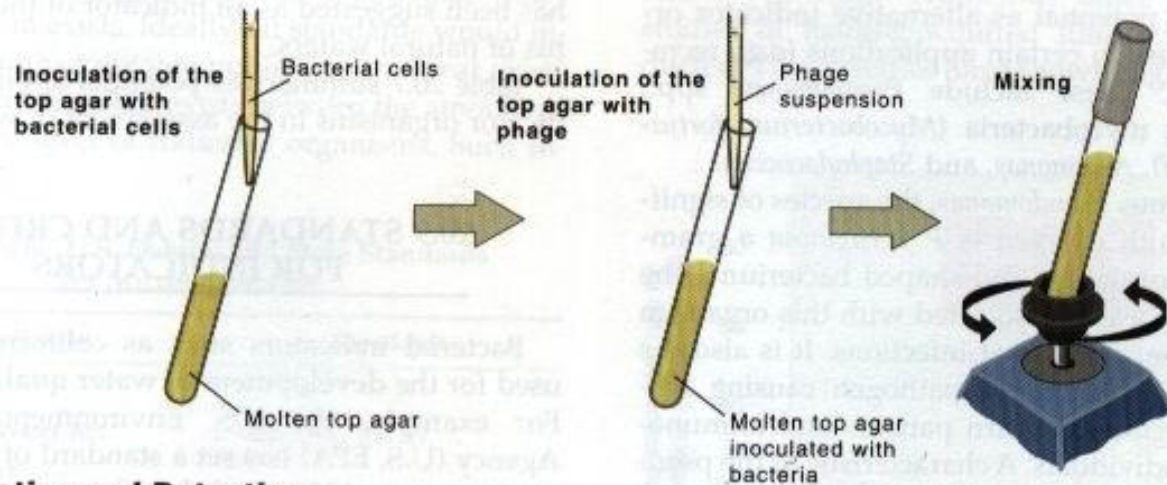
- Asilamiento sólo en aguas contaminadas (menos abundantes)
- Sin capacidad de recrecimiento
- Métodos más complejos
- Disminuyen en la misma proporción que poliovirus y rotavirus



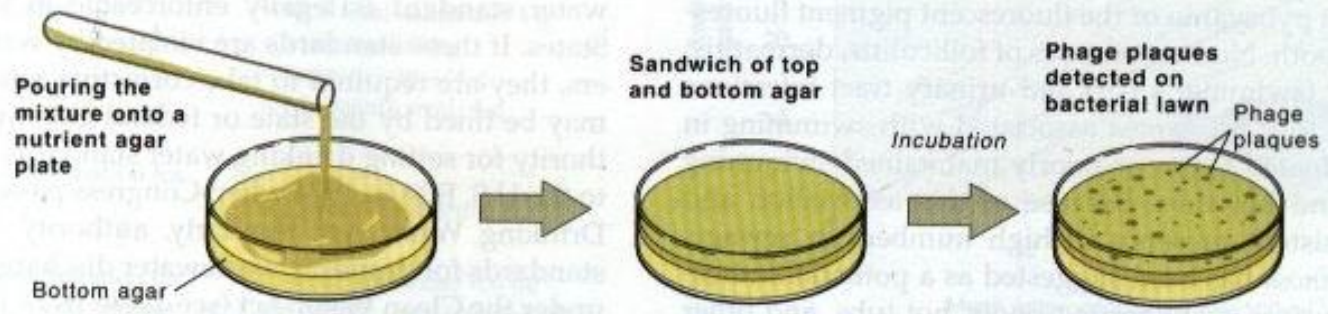
Organismos indicadores de contaminación fecal

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)



Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgo para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

Transmisión de patógenos por AARR

- Patógenos en heces y orina: alta probabilidad de llegar en número necesario para producir enfermedad
- Transmisión rápida en enfermedades hídricas
 - ✓ Mal medio de cultivo
 - ✓ Mecanismos de autodepuración → Escasa supervivencia y multiplicación de patógenos
- Contacto directo:
 - ✓ Ingestión de agua contaminada
 - ✓ Contacto cutáneo o mucoso (actividades recreativas, contacto ocupacional)
 - ✓ Infecciones (conjuntivitis, faringitis, enf. gastrointestinales)

Transmisión de patógenos por AARR

- Contacto indirecto (alimentos):
 - ✓ Verduras o frutas
 - ✓ Moluscos (criados en agua marina contaminada)
 - ✓ Vectores
- Susceptibilidad a los patógenos:
 - Edad (inmunidad y oportunidades de contagio). Ej: Rotavirus, *E. coli*
 - Higiene personal
 - Acidez gástrica
 - Moco/motilidad e integridad del epitelio intestinal
 - Inmunidad: Aumenta o disminuye la susceptibilidad

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgos para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

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

Características epidemiológicas

- Patógenos agrupados según transmisión y propiedades patógenas:

- ✓ Categoría I:

- Virus, protozoos y helmintos
- Infección sin latencia
- Transmisión predominante en el ambiente doméstico inmediato
- Gran resistencia de virus y protozoos. Brotes de criptosporidiosis

- ✓ Categoría II:

- Bacterias expulsadas por las excretas
- Infección sin latencia
- Moderadamente persistentes y capacidad de multiplicación ambiental
- Transmisión en el medio doméstico inmediato
- Problemas en planes de reutilización. Brotes de cólera

Características epidemiológicas

✓ Categoría III:

- Nemátodos intestinales
- Periodo de latencia largo. Paso previo por el suelo, sin hospedador intermediario
- Alta posibilidad de transmisión en proyectos de reutilización de AARR
- Patógenos de gran importancia. Gran resistencia (semanas/años)

✓ Categoría IV:

- *Taenia saginata* y *Taenia solium*
- Periodos largos de latencia. Alta resistencia (Semanas/años)
- Transmisión a partir de vacas o cerdos
- Riego de pastos con aguas residuales

✓ Categoría IV:

- Helmintos con uno o dos hospedadores intermediarios acuáticos
- 1º hospedador: caracol (r. asexual), 2º hospedador (pez o macrófito)
- Periodo de latencia largo
- No tienen importancia agrícola, excepto: proyectos de riego

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgos para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

Riesgos para la salud

RIESGOS REALES EN EL EMPLEO DE AARR:

- a.- Dosis infectiva de un agente patógeno llegue al campo/multiplicación en el campo hasta alcanzar dosis infectiva
- b.- Dosis infectiva llegue a una huésped humano susceptible
- c.- Infección del huésped
- d.- Infección produzca enfermedad y se transmita de nuevo

RIESGO POTENCIAL

Cuando ocurre:

a

a y b

a,b y c pero no d

Riesgo real sólo importante: exceso mensurable en la prevalencia o intensidad de la enfermedad

Riesgos para la salud

✓ INFECCIÓN: hospedador susceptible y dosis infectante

✓ FACTORES:

➤ Período de supervivencia del agente patógeno

✓ Muy variable

✓ Todos los agentes patógenos sobreviven suficiente para plantear problemas sanitarios

✓ Supervivencia mayor en suelo que en plantas (insolación y desecación)

✓ Problemas serios si el tiempo de supervivencia supera el ciclo de crecimiento de los cultivos

➤ Modo y frecuencia de aplicación de aguas residuales

✓ Forma de aplicación

✓ Intervalo de aplicación y recolección

Riesgos para la salud

✓FACTORES:

➤ Tipo de cultivo y exposición

- ✓ Riesgos para consumidores o trabajadores agrícolas
- ✓ Tipo de riego (aspersión)
- ✓ Riesgo mayor para productos consumidos crudos

➤ Comportamiento humano

- ✓ Normas adecuadas de higiene personal y alimentaria: Protección incluso en situaciones de riesgo alto
- ✓ Modificación de modelos de comportamiento: Educación sanitaria

➤ Otras vías de transmisión

- ✓ Presencia de otras vías con mayor importancia en la transmisión

Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgos para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

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
 - ✓ Tm adecuada

• Inconvenientes:

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

• Ventajas:

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

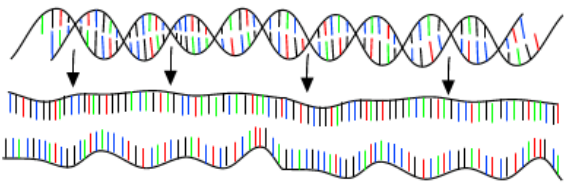
Técnicas de Biología Molecular

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

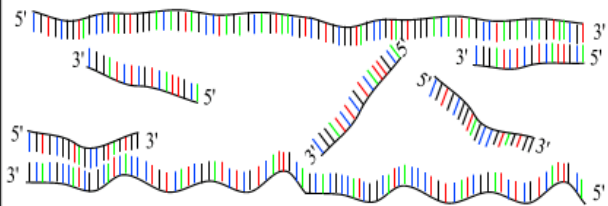
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

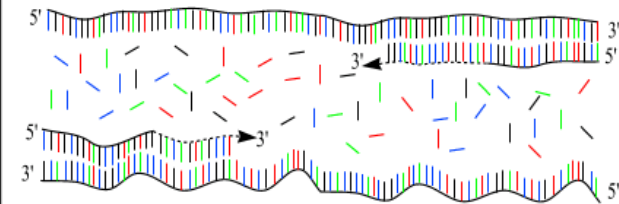
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

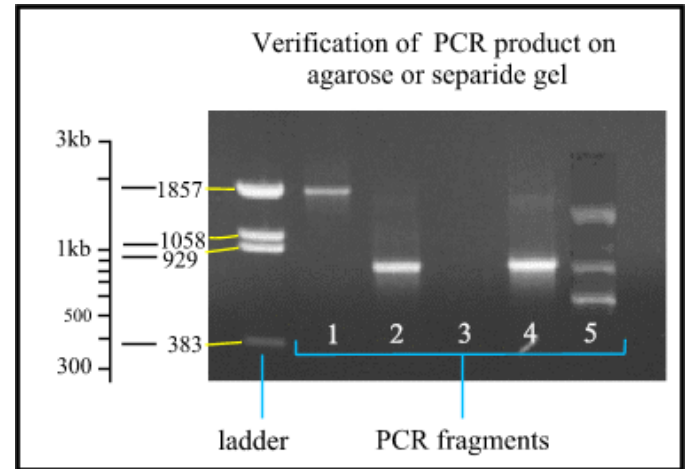
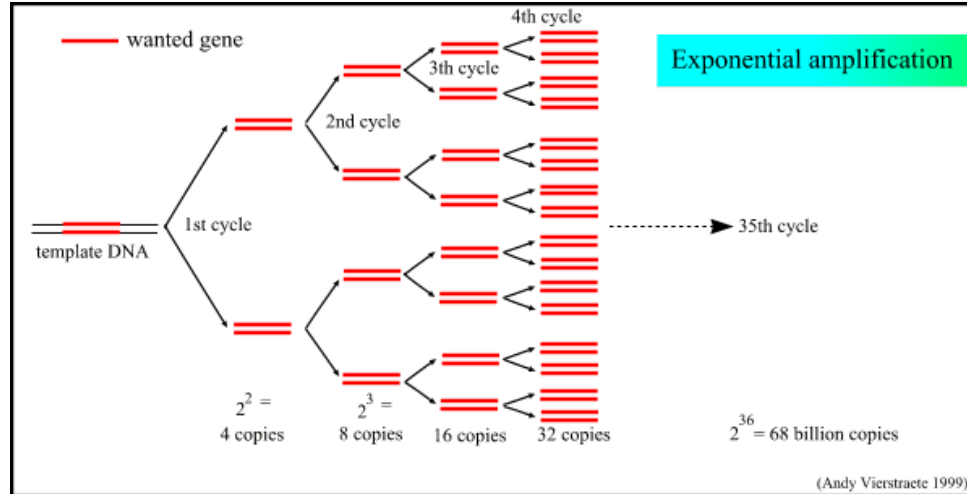


Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



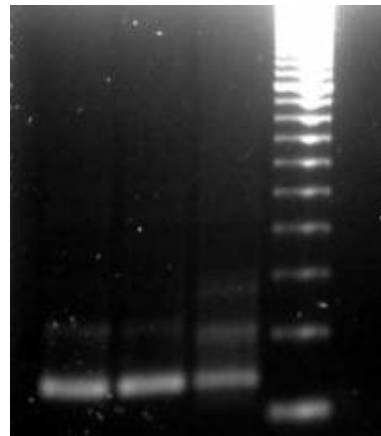
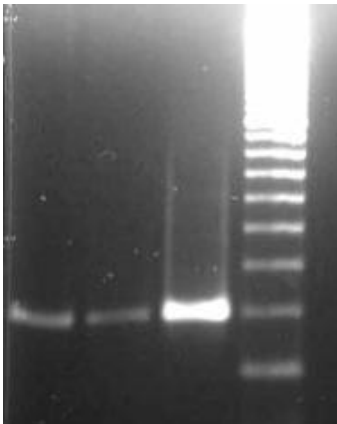
(Andy Vierstraete 1999)



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

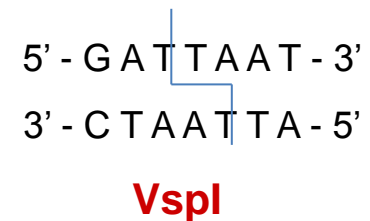
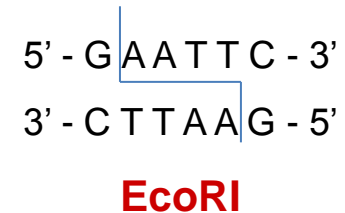
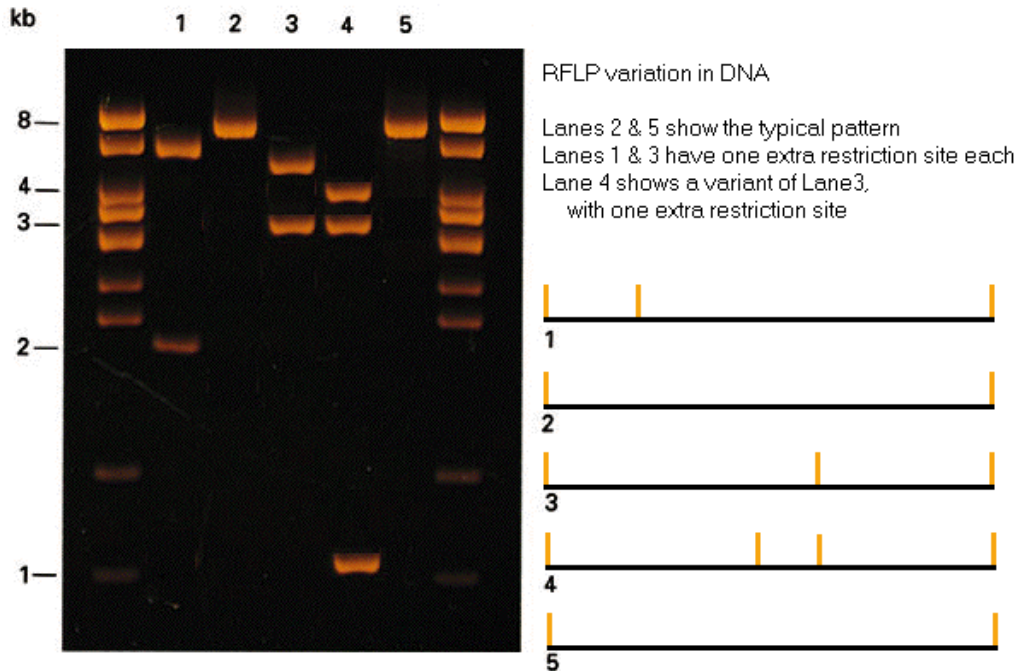
➤ Fases:

- ✓ 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

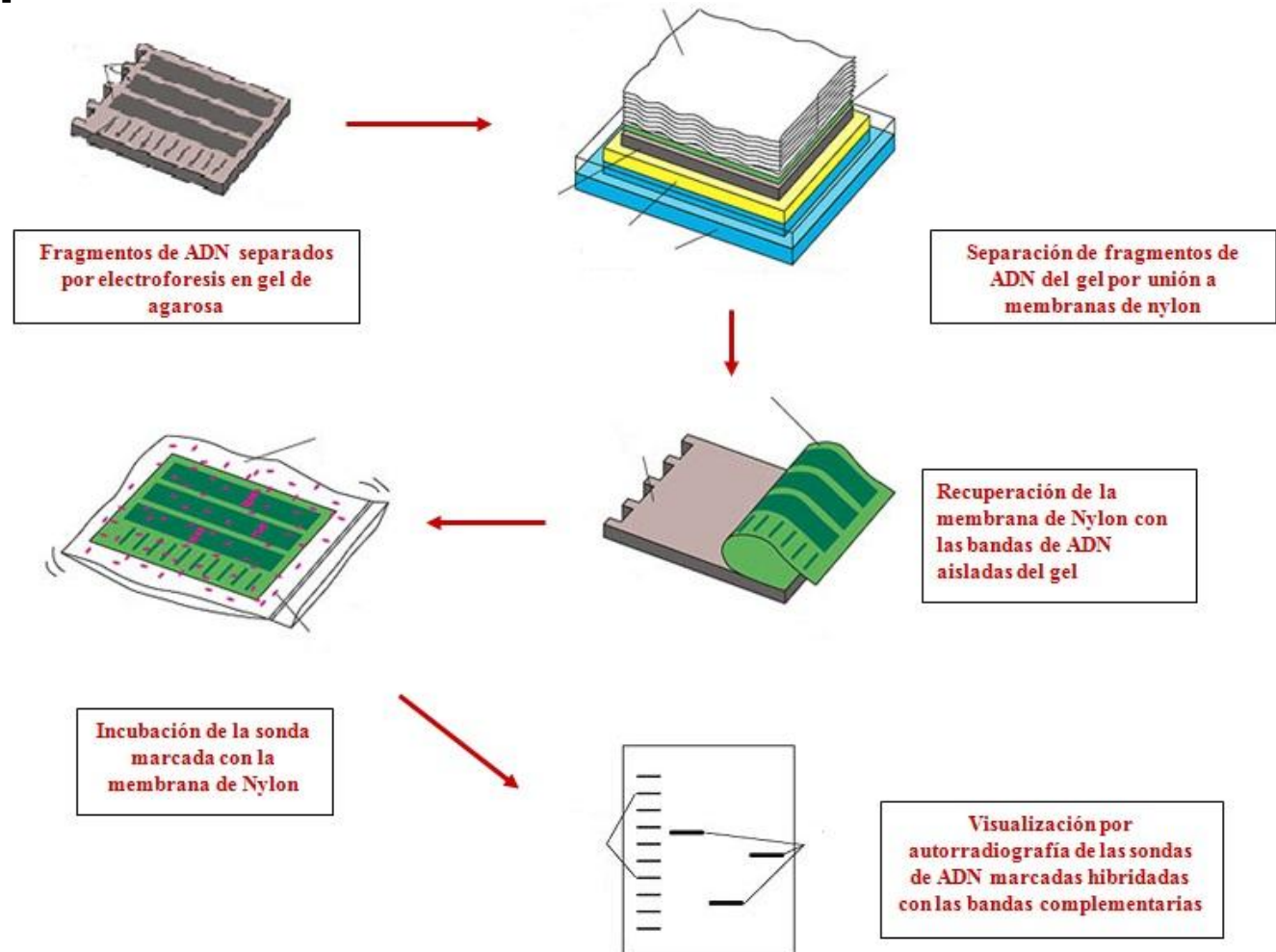
✓ Análisis de fragmentos de restricción (PCR-RFLP):

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



Técnicas de Biología Molecular

✓ Southern Blot:



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

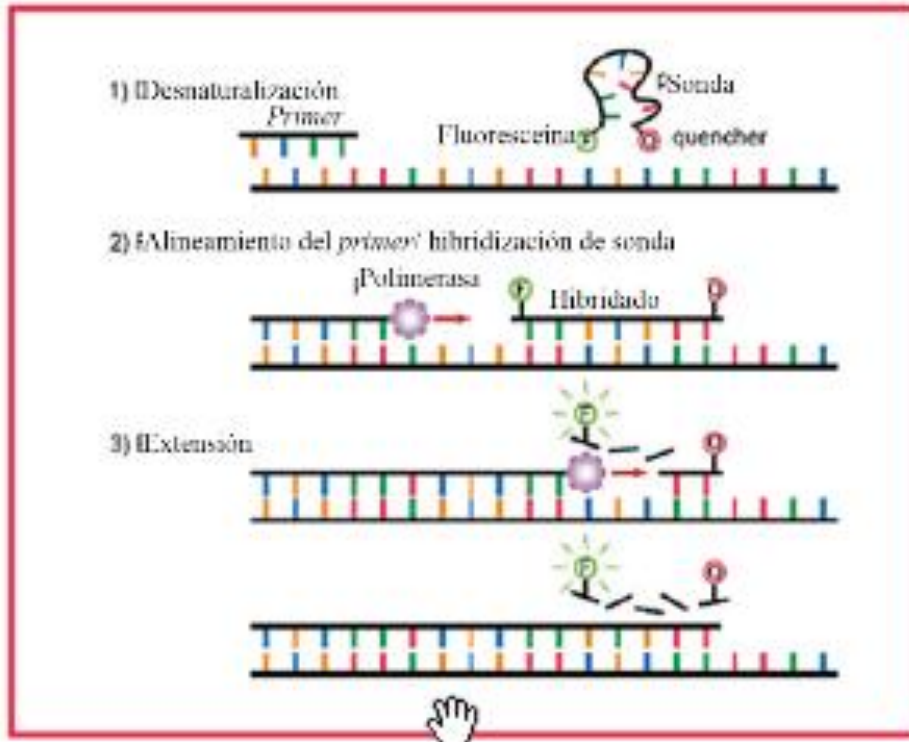
Detección del producto en cada ciclo:

- ✓ 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

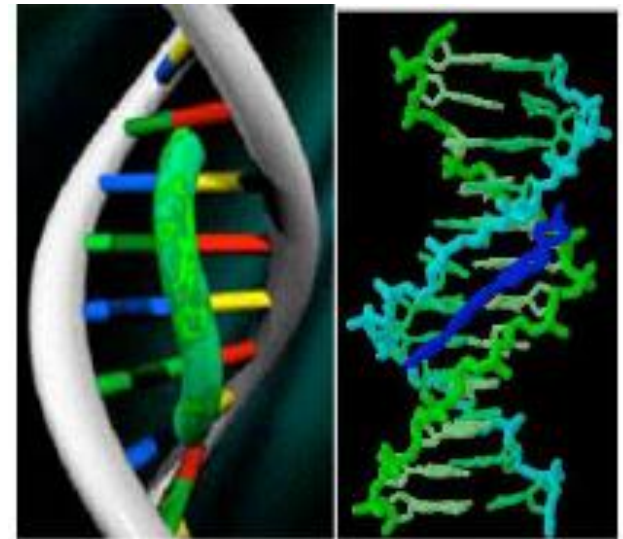
✓ PCR a tiempo real:

TaqMan PCR:



SYBR Green:

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

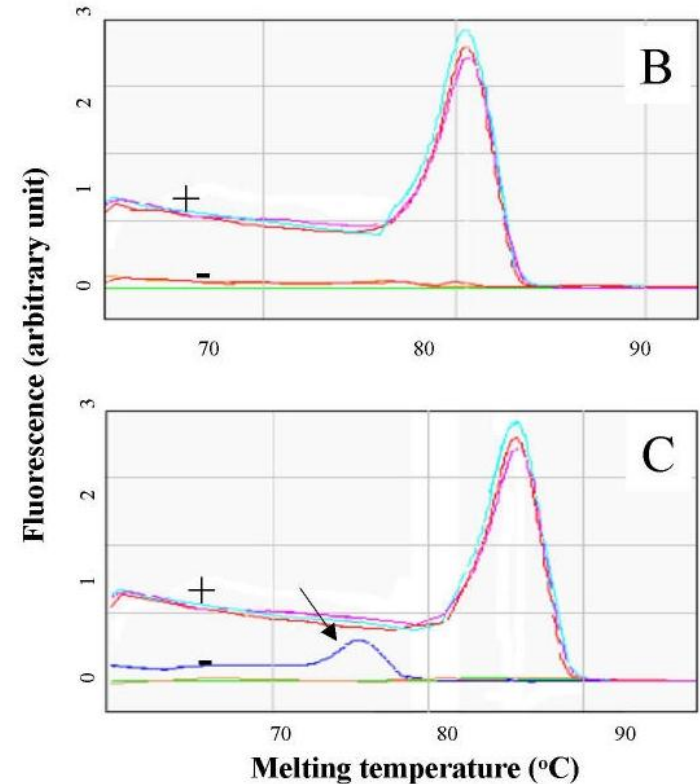


Técnicas de Biología Molecular

✓ PCR a tiempo real:

✓ Ventajas:

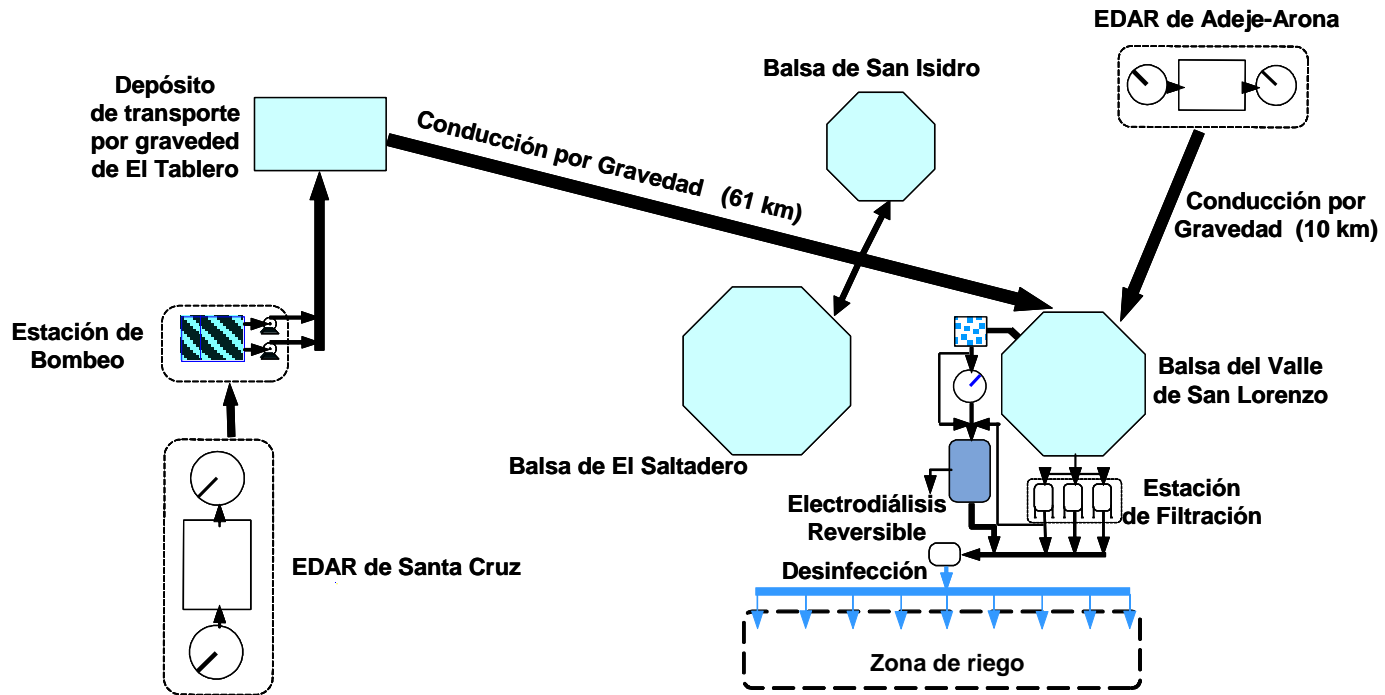
- Simple y rápida (semi-automatizada)
- No hay manipulación post-PCR
(disminución de contaminación)
- Cuantificación del ADN o ARN inicial
- Alta sensibilidad y especificidad
- Discriminación de productos inespecíficos
(análisis de T^a fusión)
- Detección de más de un producto específico en una reacción



Patógenos transmitidos por aguas residuales y regeneradas

- Componentes biológicos de las AARR
- Bacterias patógenas
- Protozoos y helmintos parásitos
- Virus entéricos
- Organismos indicadores de contaminación fecal
- Transmisión de patógenos por las AARR
- Características epidemiológicas de los patógenos entéricos
- Riesgos para la salud
- Técnicas de Biología Molecular aplicadas a la detección de patógenos en AARR
- Patógenos en AARR de Canarias

Patógenos en AARR de Canarias



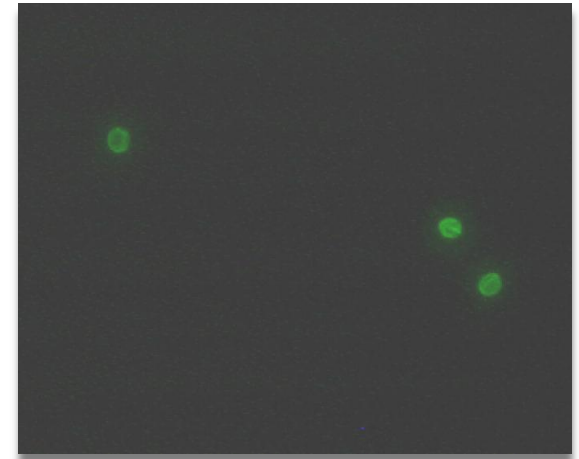
- Comportamiento de protozoos en el sistema gestionado por BALTEN
- Relaciones con indicadores y otros enteropatógenos
- Especies y genotipos de estos protozoos presentes en el sistema

Patógenos en AARR de Canarias

- Concentración/detección de quistes/ooquistes por floculación inorgánica (Vesey *et al.*, 1993)/IFD
- Identificación específica de *Giardia* sp. por amplificación del gen TPI (Foronda *et al.*, 2008)
- Indicadores bacterianos (Cf, EC, ENT, CSR)
- Indicadores víricos: (CS, ARN F-específicos)
- Cuantificación e identificación de *Pseudomonas* sp. (cultivo)
- Detección e identificación de *Salmonella* spp./*Campylobacter* spp. (mPCR)
- Detección de adenovirus entéricos

Patógenos en AARR de Canarias

- *Cryptosporidium* sp.
 - 151 muestras (18,4%)
 - Disminución del nº al final del sistema
 - Factores que intervienen: filtración, sedimentación, retención en biofilms, predación
 - Bajo contenido en ooquistes y bajo % de muestras positivas: alto contenido en m.o. y baja sensibilidad de la técnica
 - Nº de muestras similar en invierno que en verano
 - Presencia de *C. hominis*



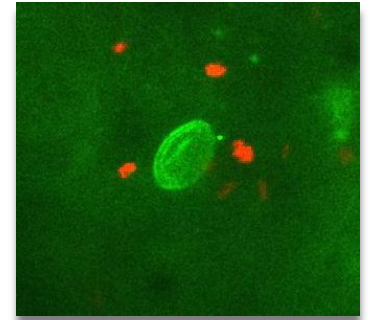
Patógenos en AARR de Canarias

Microorganismo	<i>Cryptosporidium</i> (-)			<i>Cryptosporidium</i> (+)		
	Media geométrica	Desv. típica	n(%)	Media geométrica	Desv. típica	n(%)
CF	4,37	1,16	110(80,88)	4,98	1,03	26(19,11)
EC	3,67	1,23	105(81,15)	4,43	1,18	26(19,85)
ENT	3,87	1,08	92(80,00)	4,53	1,08	23(20,00)
CSR	3,68	1,02	79(80,61)	4,35	0,87	19(19,39)
CS	4,08	0,94	68(80,95)	4,75	0,65	16(19,05)
ARNF	2,39	0,63	43(79,63)	2,46	0,48	11(20,37)
PSE	4,18	1,04	13(76,47)	4,47	0,44	4(23,53)
PAER	3,97	1,36	8(66,67)	4,21	0,97	4(33,33)

<i>Cryptosporidium</i>	Niveles de <i>E. coli</i> (ufc/100 ml)			
	<200	200-1000	1000-10000	>10000
Presencia	2(12,50%)	0	8 (22,86%)	16 (62,68%)
Ausencia	14	13	27	51
Total	16	13	35	67

Patógenos en AARR de Canarias

- *Giardia* sp.
 - 151 muestras (46,7%)
 - Presentes en todos los puntos y con concentraciones variables
 - Tratamiento avanzado sin efecto (agregación de quistes)
 - Factores que intervienen: sedimentación, retención en biofilms, predación
 - Contenido de quistes similar a otros trabajos: técnica con sensibilidad aceptable
 - N° de muestras similar en invierno que en verano

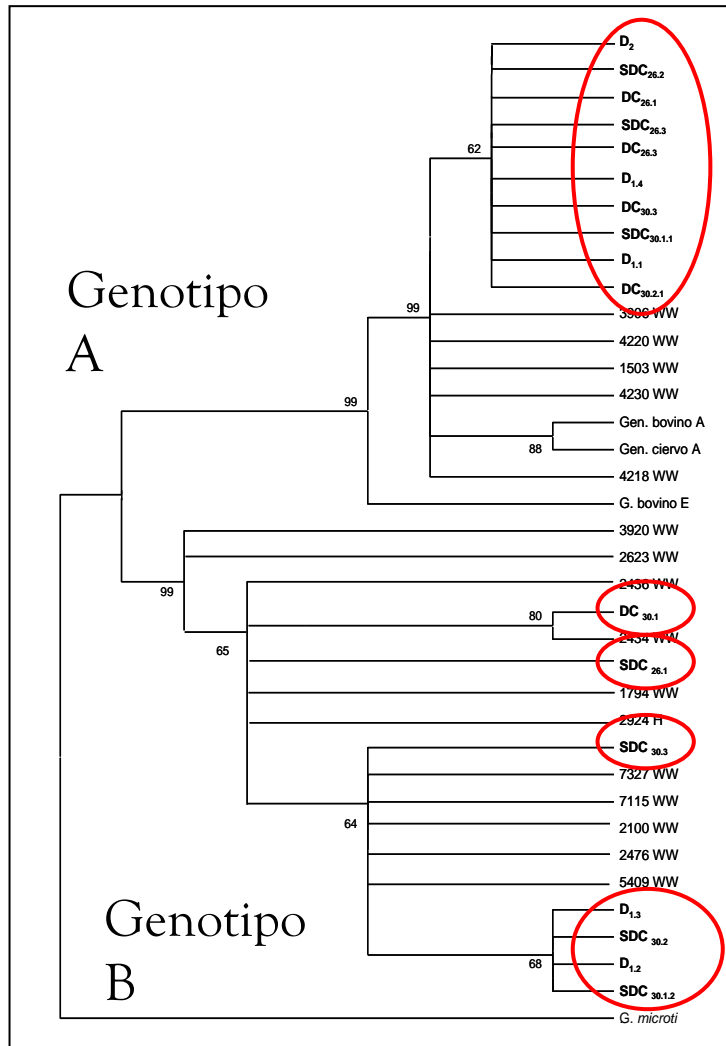


Patógenos en AARR de Canarias

Microorganismo	<i>Giardia</i> (-)			<i>Giardia</i> (+)		
	Media geométrica	Desv. típica	n(%)	Media geométrica	Desv. típica	N(%)
CF	4,20	1,12	70(51,47)	4,80	1,13	66(48,53)
EC	3,56	1,10	62(47,33)	4,05	1,31	69(52,67)
ENT	3,88	0,97	54(46,95)	4,08	1,19	61(53,04)
CSR	3,64	1,08	49(50,00)	3,98	0,94	49(50,00)
CS	4,24	0,84	38(45,23)	4,16	0,98	46(54,76)
ARNF	2,39	0,73	22(40,74)	2,41	0,50	32(59,26)
PSE	4,47	-	1(5,88)	4,24	0,95	16(94,12)
PAER	-	-	-	4,05	1,19	12(100,00)

<i>Giardia</i>	Niveles de <i>E. coli</i> (ufc/100 ml)			
	<200	200-1000	1000-10000	>10000
Presencia	6(37,5%)	4(30,76%)	17 (48,57%)	42 (62,68%)
Ausencia	10	9	18	25
Total	16	13	35	67

Patógenos en AARR de Canarias



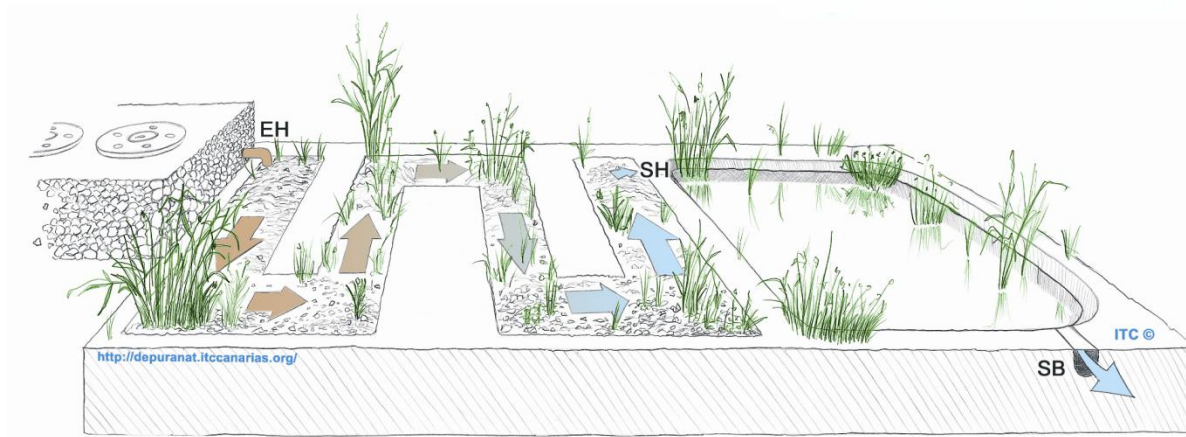
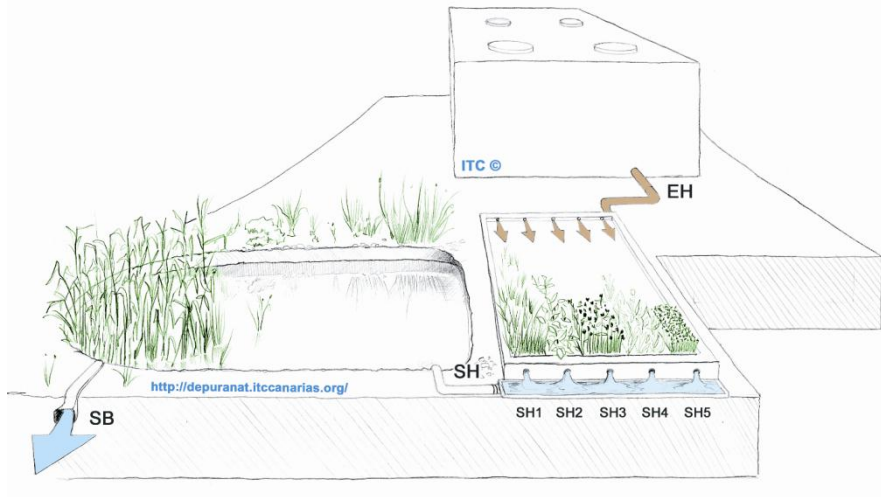
Especies y genotipos de *Giardia* sp.

- Muestras EDAR y Estación de bombeo
- Producto de PCR 530 pb (TPI)
- Estudios de homologías: *G. duodenalis*
- Mezcla de genotipos
- 17 haplotipos no publicados (58,8% A; 41,2% B)
- Aporte humano de *Giardia duodenalis*
- Genotipo A mayoritario

Patógenos en AARR de Canarias

- Niveles de quistes y ooquistes sugieren una mayor incidencia de *Giardia* sp.
- Falta de correlación entre protozoos e indicadores fecales
- Necesidad de la determinación de protozoos parásitos
- Riesgo de infección por la presencia de *G. duodenalis* y *C. hominis*
- Propuesta de *Giardia* sp. como indicador en aguas residuales y regeneradas

Patógenos en AARR de Canarias



Patógenos en AARR de Canarias

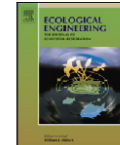
Ecological Engineering 37 (2011) 496–503



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoleng



Occurrence and removal of parasites, enteric bacteria and faecal contamination indicators in wastewater natural reclamation systems in Tenerife–Canary Islands, Spain

Néstor Abreu-Acosta^{a,*}, Luisa Vera^b

^a University Institute of Tropical Illness and Public Health, University of La Laguna, Avda. Astrof. Fco Sanchez, s/n, 38200 – La Laguna, Tenerife, Spain

^b Water Department, Canary Islands Institute of Technology (ITC), Plaza de Sixto Machado, 3, 38009 – Santa Cruz de Tenerife, Tenerife, Spain

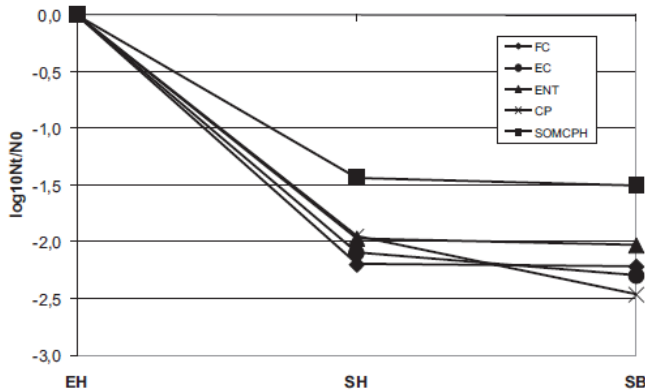


Fig. 5. Survival of the various indicator microorganisms studied in Carrizal Alto. N_i : initial point value; N_f : final point value; FC: faecal coliforms; EC: *Escherichia coli*; ENT: Enterococci; CP: *Clostridium perfringens*; SOMCPH: somatic coliphages; EH: constructed wetland inlet; SH: constructed wetland outlet; SB: storage pond outlet

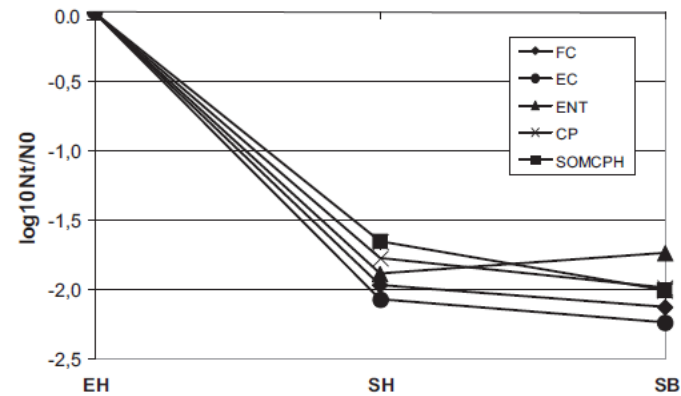


Fig. 3. Survival of the various indicator microorganisms studied in Albergue Bolicó. N_0 : initial point value; N_f : final point value; FC: faecal coliforms; EC: *Escherichia coli*; ENT: Enterococci; CP: *Clostridium perfringens*; SOMCPH: somatic coliphages; EH: constructed wetland inlet; SH: constructed wetland outlet; SB: storage pond outlet



Patógenos en AARR de Canarias

Table 1

Presence/absence of pathogen microorganisms in water samples with various levels of faecal pollution in Albergue de Bolicó Wastewater Treatment System.

Species	<i>E. coli</i> range ^a			
	<200	200–1000	1000–10,000	>10,000
<i>Giardia</i> sp.				
Presence ^b	0	0	0	1 (10.0)
Absence	3	5	4	9
Total	3	5	4	10
<i>Cryptosporidium</i> sp.				
Presence	0	0	0	1 (10.0)
Absence	3	5	4	9
Total	3	5	4	10
<i>Salmonella</i> sp.				
Presence	0	1 (11.1)	1 (25.0)	2 (15.4)
Absence	5	8	3	11
Total	5	9	4	13
<i>Campylobacter</i> sp.				
Presence	0	2 (33.3)	1 (33.3)	5 (71.4)
Absence	1	4	2	2
Total	1	6	3	7

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.

Table 2

Presence/absence of pathogen microorganisms in water samples with various levels of faecal pollution in Carrizal Alto Wastewater Treatment System.

Species	<i>E. coli</i> range ^a			
	<200	200–1000	1000–10,000	>10,000
<i>Giardia</i> sp.				
Presence ^b	2 (16.7)	0	1 (25.0)	1 (25.0)
Absence	10	1	3	4
Total	12	1	4	4
<i>Cryptosporidium</i> sp.				
Presence	0	0	0	1 (25.0)
Absence	6	4	4	3
Total	6	4	4	4
<i>Salmonella</i> sp.				
Presence	0	1 (14.3)	0	1 (16.7)
Absence	11	6	2	5
Total	11	7	2	6
<i>Campylobacter</i> sp.				
Presence	1 (16.7)	1 (33.3)	0	0
Absence	5	2	1	3
Total	6	3	1	3

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.

Table 3

Concentrations (CFU or PFU) of indicator microorganisms in relation to the presence/absence of *Giardia* sp. in Carrizal Alto Wastewater Treatment System.

Indicator	<i>Giardia</i> (–)			<i>Giardia</i> (+)		
	Geometric mean	S.D.	N (% positive)	Geometric mean	S.D.	N (% positive)
FC	2.69	1.44	16 (80.00)	2.54	1.40	4 (20.00)
EC	2.51	1.43	15 (78.94)	3.11	1.15	3 (15.79)
ENT	2.61	1.16	16 (94.12)	4.74	–	1 (5.88)
CP	2.09	1.25	16 (94.12)	3.46	–	1 (5.88)
SOMCPH	2.76	1.02	17 (85.00)	4.33	0.25	3 (15.00)

Values are given in log₁₀ units. FC: faecal coliforms; EC: *Escherichia coli*; ENT: Enterococci; CP: *Clostridium perfringens*; SOMCPH: somatic coliphages.

Patógenos en AARR de Canarias

- Eliminación eficaz de los protozoos parásitos en ambos sistemas
- Inactivaciones elevadas de indicadores fecales
- Humedal etapa con mayor eficacia
- SDN de Carrizales produce efluentes de mayor calidad
- Control de calidad basado en EC, CP ó CS y *Giardia* sp.
- Presencia de *Salmonella* y *Campylobacter* en efluentes: posible riesgo

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