

Huevecillos de Helmintos: una validación para su determinación y cuantificación en aguas, aguas residuales y lodos de Costa Rica

Helminth eggs: a validation for their determination and quantification in water, wastewater and sludge of Costa Rica

Ernesto Alfaro-Arrieta¹, Juan José Alfaro-Lara², Johanna Méndez-Araya³, Catalina Solís-Calderón⁴, Ilena Vega-Guzmán⁵

Alfaro-Arrieta, E; Alfaro-Lara, J.J; Méndez-Araya, J; Solís-Calderón, C; Vega-Guzmán, I. Huevecillos de Helmintos: una validación para su determinación y cuantificación en aguas, aguas residuales y lodos de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 60 Años del Laboratorio Nacional de Aguas. Diciembre, 2024. Pág. 121-128.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i8.7101>

- 1 Laboratorio Nacional de Aguas. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Costa Rica.
 ealfaro@aya.go.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-1317-446X>
- 2 Laboratorio Nacional de Aguas. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Costa Rica.
 jalfaro@aya.go.cr
 <https://orcid.org/0009-0004-8749-8311>
- 3 Laboratorio Nacional de Aguas. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Costa Rica.
 jomendez@aya.go.cr
 <https://orcid.org/0009-0002-8968-4738>
- 4 Laboratorio Nacional de Aguas. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Costa Rica.
 csolis@aya.go.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-7896-9474>
- 5 Laboratorio Nacional de Aguas. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Costa Rica.
 ivega@aya.go.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-0690-3388>

Palabras clave

Huevecillos de Helmintos; nemátodos; aguas; aguas residuales; lodo; validación

Resumen

La presencia de huevecillos de helmintos en el agua representa una problemática de salud pública y ambiental, que puede llegar a afectar una gran cantidad de la población. Ante la ausencia de una metodología actualizada y validada y la falta de indicación en las regulaciones de Costa Rica. Se propone una metodología para la identificación de huevecillos de helmintos en aguas, aguas residuales y lodos. Se realizó la validación de la técnica evaluando nueve parámetros de desempeño como: Límites de Detección, Límites de Cuantificación, Repetibilidad, Reproducibilidad, Especificidad, Selectividad, Sensibilidad, Incertidumbre y Veracidad. Se analizaron muestras de cada una de las matrices inoculando un 50% de las mismas con huevecillos de helmintos provenientes de un material de referencia certificado, se optimizaron las metodologías establecidas a través de procesos de sedimentación y centrifugación de la muestra para obtener una recuperación aceptable. Los resultados obtenidos de la validación fueron conformes con respecto a las metodologías de referencia y a lo requerido para el cumplimiento de la legislación nacional al establecer una metodología adecuada para la identificación y cuantificación de huevecillos de helmintos.

Keywords

Helminth eggs; nematodes; water; wastewater; sludge; validation.

Abstract

The presence of helminth eggs in water represents a public and environmental health problem, which can affect a large number of the population. Given the lack of an updated and validated methodology and the lack of indication in Costa Rican regulations, a methodology is proposed for the identification of helminth eggs in water, wastewater and sludge. The validation of the technique was carried out by evaluating nine performance parameters such as: Limits of Detection, Limits of Quantification, Repeatability, Reproducibility, Specificity, Selectivity, Sensitivity, Uncertainty and Veracity. Samples of each of the matrices were analyzed by inoculating 50% of them with helminth eggs from a certified reference material. The established methodologies were optimized through sample sedimentation and centrifugation processes to obtain an acceptable recovery. The results obtained from the validation were in accordance with the reference methodologies and with what is required for compliance with national legislation by establishing an appropriate methodology for the identification and quantification of helminth eggs.

Introducción

El término helminto se refiere a la designación de un amplio grupo de gusanos tanto parásitos como de vida libre, de distintos tamaños y formas. Dentro de estos los más representativos son los huevecillos de *Ascaris* spp, ya que presentan una alta resistencia a condiciones físicas logrando sobrevivir durante largos periodos en diversos ambientes [1], ejemplos de estos serían las aguas residuales y los biosólidos.

Estos huevecillos de helmintos también se encuentran a nivel ambiental y su importancia es alto grado en salud pública, debido a sus características de resistencia a condiciones ambientales adversas como temperatura, pH, humedad y en el caso de las aguas, de niveles de desinfección con cloro [2].

Su presencia en aguas residuales ha sido de los principales riesgos para la salud pública a raíz de la mala gestión, del reuso de estas aguas para agricultura o irrigación [3] o de la disposición final de los lodos residuales que pueda generar un contacto con la población. Dicho reuso, a menudo sin tratamiento previo, conducen a la proliferación de huevecillos de helmintos, la etapa infecciosa del ciclo de vida de los helmintos [4]. Globalmente, la helmintiasis afecta a cinco millones de personas, principalmente en lugares donde el saneamiento es deficiente, provocando que el contacto con aguas residuales sea una de las principales causas de esta enfermedad y la importancia del análisis de estas [5].

En Costa Rica, existen registros realizados por Murillo & Peinador [6] en distintos sistemas de tratamiento en los cuales se obtuvo la presencia de nemátodos intestinales como *A. lumbricoides*, *E. histolytica*, *L. intestinalis* obteniendo una remoción deficiente de huevecillos de helmintos en sistemas de tratamiento. Actualmente la normativa costarricense se ajusta a lo establecido por la OMS en el 2006 estableciendo como máximo permisible una concentración de huevecillos de helmintos de 1 ud por litro de agua tratada [7], y para lodos residuales de (1-10) ud por gramo de lodo dependiendo de su disposición final [8].

En los últimos años, las enfermedades causadas por parásitos intestinales han sido descuidadas en países tropicales y se ha visto demostrado en la presencia de huevecillos de helmintos en las aguas residuales [9].

Este estudio tuvo como objetivo proponer una validación de una metodología para el la obtención e identificación de huevecillos de helmintos en Costa Rica en distintas matrices.

Metodología

Preparación de la muestra

Para la validación se utilizaron muestras de agua potable, aguas residuales y lodo estériles y se inocularon con suspensiones de patrones certificados de huevecillos de helmintos, se utilizaron suspensiones certificadas de *Trichuris trichiura* (FP08 Microbiologics®), *Ascaris lumbricoides* (FP05 Microbiologics®) y de *Taenia* sp. (FP04 Microbiologics®). Se inoculó con una gota de cada suspensión, cada gota de la suspensión contiene aproximadamente 3 huevecillos de helmintos. De igual manera se analizaron muestras estériles sin inocular de cada una de las matrices.

Procedimiento

Agua Potable

Las muestras de agua potable se dejaron sedimentar por 24 horas. Pasado el tiempo de sedimentación se aspiró, con una bomba de vacío el sobrenadante hasta dejar un máximo de 1 litro de la muestra.

Se filtró el sedimento a través de un tamiz de 20 micras, realizando lavados con agua desionizada y se recuperaron en tubos para centrifuga de 50 mL. Seguidamente se centrifugó a 600 g por 5 minutos, se aspiró el sobrenadante hasta dejar entre 1-2 mL.

Para el aislamiento de los huevecillos de Helmintos se homogeneizó y procedió a cuantificar e identificar utilizando una celda Sedgwick-Rafter.

Agua Residual

Se realizó basado en lo establecido por SEMARNAT [10], [11] para la determinación de huevecillos de helmintos. Para las muestras de aguas residuales se tomaron 5 Litros de muestra y se pasó por un tamiz de 125 micras y se dejó sedimentar en un beaker plástico de 5 litros durante 24 horas.

Lodos

Se realizó basado en lo establecido por SEMARNAT [10], [11]. Para los Lodos Residuales se pesaron entre (2-5) gramos de cada muestra, se licuó por 5 minutos a alta velocidad en una licuadora industrial utilizando 200 mL de solución de Tween 80 al 0,1%. Una vez homogenizado se pasó el licuado por un tamiz de 125 micras realizado lavados y se depositó en un beaker plástico de 5 litros. Se dejó sedimentar durante toda la noche.

Para las matrices de aguas residuales y lodos, el aislamiento de los huevecillos de Helmintos se realiza seguidamente que se aspira, de la muestra sedimentada, el sobrenadante al máximo y depositó el sedimento en una botella de centrifuga de 250 mL, realizando de 2 a 3 enjuagues del recipiente de 5 litros. Se centrifugó a 600 g por 5 minutos. Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante por vacío y se resuspendió la pastilla en 150 mL de Sulfato de Zinc 33 %. Se volvió a centrifugar a 600 g por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante vertiéndolo en un recipiente de 2 litros, se le agregó agua destilada hasta llegar al máximo del recipiente y se dejó sedimentar toda la noche.

Pasado el tiempo de sedimentación, se aspiró al máximo el sobrenadante por vacío, se resuspendió el sedimento por agitación agitando y se pasó a tubos para centrifuga cónicos de 50 mL. Seguidamente se centrifugó a 600 g por 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en 15 mL de solución de alcohol-acido (H_2SO_4 0.1 N + C_2H_5OH) a 33-35% y 10 mL de acetato de etilo.

Se agitó suavemente y se centrifugó a 600 g por 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante hasta dejar mínimo 1 ml de líquido, homogeneizar la pastilla y proceder a cuantificar e identificar utilizando una celda Sedgwick-Rafter.

Validación de la Técnica

Para la validación de la muestra se analizaron los criterios de validación establecidos por el Ente Costarricense de Acreditación [12]:

1. Para el cálculo de los Límites de Detección y Cuantificación

Se inocularon 5 litros de agua destilada con una Suspensión de *Ascaris lumbricoides* (FP05), de *Trichuris trichiura* (FP08) y de *Taenia* sp (FP04) y se analizó según el procedimiento. El conteo de la muestra se realizó siete veces por el mismo analista. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

2. Repetibilidad y Reproducibilidad

Se inocularon 5 litros de agua destilada con una Suspensión de *Ascaris lumbricoides* (FP05) y de *Trichuris trichiura* (FP08). Seguidamente se separó la muestra en 5 beakers estériles con 1 litro de la suspensión y se analizó cada beaker según el procedimiento. Cada analista realizó el conteo de huevecillos de helmintos siete veces. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Se realizó una Prueba F para evaluar los porcentajes de repetibilidad entre un mismo analista, así como los porcentajes de reproducibilidad entre los distintos analistas.

3. Especificidad

Para la determinación de la especificidad se analizó si la metodología planteada es capaz de obtener resultados negativos en los casos que no haya presencia del organismo

4. Selectividad y Sensibilidad

Con el análisis de las muestras inoculadas se analizó si la metodología era capaz de determinar y cuantificar las distintas especies de huevecillos de helmintos inoculadas.

5. Incertidumbre

Se realizó el cálculo de la incertidumbre para el método con un modelo matemático que permitiera cuantificar los distintos componentes que aportaran a la incertidumbre. Se tomó en cuenta la determinación de la incertidumbre combinada con un factor de cobertura de $k= 2$, 95 %, contemplando la incertidumbre de la medición de volumen, la asociada al muestreo y al conteo de los huevecillos.

6. Veracidad

Se participó en una ronda interlaboratorial internacional para la comprobación de los niveles de veracidad de la técnica, se participó en la ronda de intercomparación N° 2/ PP1007 de la empresa IELAB acreditada en la Norma ISO 17043.

Resultados

Los resultados del cálculo de los límites de detección y cuantificación se muestran en el cuadro 1, los cuales demuestran la capacidad del método de recuperar los huevecillos de helmintos inoculados, ya que se inoculó con un máximo de 3 huevecillos de helmintos por gota, y se logró cuantificar mínimo 1 huevecillo de helminto en los controles inoculados y 0 huevecillos en los controles negativos. Con un porcentaje de recuperación promedio 40% y 60 % para agua potable, para aguas residuales y para Lodos que es apto para la técnica de extracción implementada, como es de esperar menores conteos para matrices complejas como lo son las aguas residuales y lodos, pero en todos los casos con porcentajes aceptados para la metodología. Además, se detectó al menos un huevecillo según se requiere para la reglamentación nacional vigente.

Cuadro 1. Cantidad de huevecillos de *Trichuris trichiura* cuantificados en cada muestra.

Repetición/ Matriz de muestra	1	2	3	4	5	6	7
Agua Potable	1±1 ud/L	1±1 ud/L	2±1 ud/L	1±1 ud/L	3±1 ud/L	2±1 ud/L	1±1 ud/L
Aguas Residuales	2±1 ud/L	1±1 ud/L	1±1 ud/L	1±1 ud/L	2±1 ud/L	2±1 ud/L	1±1 ud/L
Lodos	1±1 ud/g	2±1 ud/g	1±1 ud/g	2±1 ud/g	1±1 ud/g	1±1 ud/g	2±1 ud/g

En todas las muestras que no fueron inoculadas con los organismos controles, se obtuvieron resultados negativos ante la ausencia de huevecillos de helmintos.

En el cuadro 2 se detalla los resultados de los análisis de repetibilidad y reproducibilidad, se observa que para todos los analistas se obtuvieron valores dentro de lo aceptado según lo establecido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [13], en donde se establece que los valores de porcentajes de repetibilidad deben ser menores al 5% para cada analista y los de reproducibilidad menores al 10% entre analistas. Se obtuvieron resultados de repetibilidad menores al 1% y de reproducibilidad menos al 2%.

Cuadro 2. Análisis de Repetibilidad y Reproducibilidad en cada matriz.

PARÁMETRO/Analista-Repetición	Ascaris lumbricoides (ud/L)	Trichuris trichiura (ud/L)	Repetibilidad	Reproducibilidad
Análista A-1	17	5	0.74	1.37
Análista A-2	16	5		
Análista A-3	16	5		
Análista A-4	17	5		
Análista A-5	17	5		
Análista A-6	17	5		
Análista A-7	17	5		
Control Negativo Analista A	Negativo	Negativo		
Análista B-1	15	7	0.54	1.37
Análista B-2	15	8		
Análista B-3	15	8		
Análista B-4	15	8		
Análista B-5	15	8		
Análista B-6	15	8		
Análista B-7	15	8		
Control Negativo Analista B	Negativo	Negativo		
Análista C-1	17	3	0.79	1.37
Análista C-2	17	3		
Análista C-3	18	3		
Análista C-4	18	3		
Análista C-5	18	3		
Análista C-6	18	3		
Análista C-7	18	3		
Control Negativo Analista C	Negativo	Negativo		
Análista D-1	24	5	0.38	1.37
Análista D-2	24	5		
Análista D-3	24	6		
Análista D-4	24	5		
Análista D-5	24	5		
Análista D-6	24	5		
Análista D-7	24	6		
Control Negativo Analista D	Negativo	Negativo		

En los estudios de especificidad, el método fue capaz de dar negativo cuando no se inoculó el analito, por lo que se toma como un resultado satisfactorio.

Para el caso de la determinación de la selectividad y la sensibilidad, la metodología demostró que aísla satisfactoriamente los huevecillos de helmintos inoculados con las características de especie deseadas. Esto se corroboró con la inoculación de distintos tipos de huevecillos

de helmintos con características definidas y diferentes que se observaron al microscopio permitiendo identificarlos, en la figura 1 se muestran huevecillos de *Trichuris trichiura* y *Ascaris lumbricoides* observados en 10X.

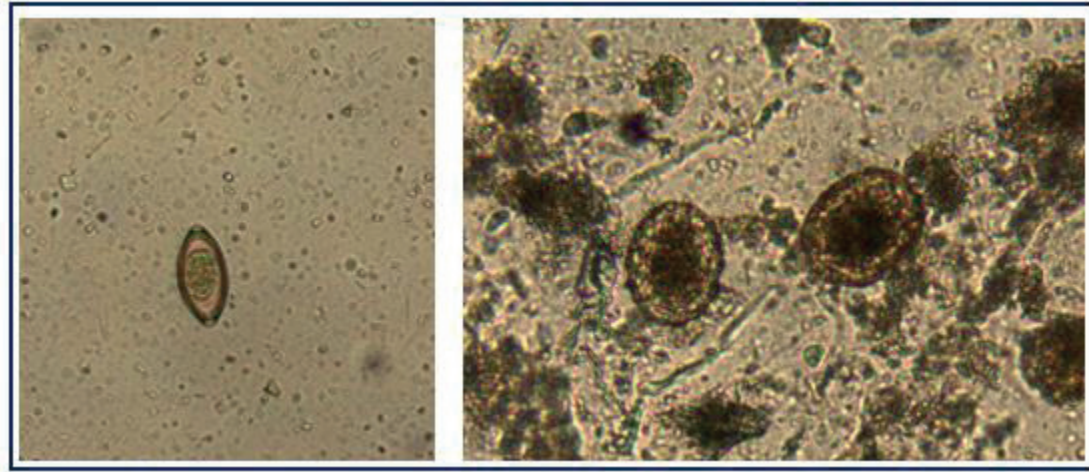


Figura 1. Huevecillos de *Trichuris trichiura* y *Ascaris lumbricoides* observados en 10X.

Para el cálculo de la incertidumbre se obtuvo una μ expandida de 0.56 con un factor de cobertura de $K= 2$, 95 %, por lo que debido a la naturaleza de los organismos estudiados se estableció una incertidumbre final de ± 1 ud/L y ± 1 ud/g.

Los resultados de veracidad y de la intercomparación se obtuvieron resultados satisfactorios de las pruebas con un resultado final de Z-score de -0.5, mucho mejor de lo esperado, ya que según la literatura se deben obtener valores menores a < 2 para resultados satisfactorios.

Conclusiones

Los resultados muestran que la técnica utilizada para la cuantificación e identificación de helmintos demuestra una adecuada recuperación de los huevecillos de helmintos inoculados, aproximadamente entre (30-60) %, esto coincide con los resultados obtenidos por Jimenez-Cisneros [5], en donde se obtuvieron porcentajes similares de recuperación de huevecillos de helmintos, por lo que la validación de ésta técnica permite ser utilizada en las distintas matrices, como lo son agua potable, aguas residuales o distintos tipos de lodos dentro del país.

Estos resultados satisfactorios permitieron al Laboratorio Nacional de Aguas del AyA obtener la acreditación de la técnica en la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017, y convertirse en el primer Laboratorio en Costa Rica en tener dicha acreditación para la determinación y cuantificación de Huevecillos de Helmintos.

El tener una técnica acreditada que permita la adecuada identificación y cuantificación de huevecillos de helmintos es necesario debido a que son un indicador importante de contaminación fecal, principalmente para aguas que están destinadas a consumo o aguas residuales destinadas para reuso con contacto primario [2].

Estos resultados son de gran importancia ya que permite aplicar la técnica para lograr el cumplimiento de las distintas regulaciones nacionales como lo son el Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales [7], el Reglamento para el Manejo y Disposición Final de Lodos y Biosólidos [8] y el Reglamento para la Calidad del Agua Potable [14].



Agradecimientos

Se agradece a todo el personal del Laboratorio Nacional de Aguas que realizaron los muestreos de agua potable, aguas residuales y lodos.

Referencias

- [1] Jiménez, B., Maya, C., Sánchez, E., Romero, A., Lira, L., & Barrios, J. A. (2002). Comparison of the quantity and quality of the microbiological content of sludge in countries with low and high content of pathogens. *Water Science and Technology*, 46(10), 17–24. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0278>
- [2] Campos, M. C., Beltrán, M., Fuentes, N., & Moreno, G. (2018). Huevos de helmintos como indicadores de contaminación de origen fecal en aguas de riego agrícola, biosólidos, suelos y pastos. *Biomedica*, 38(1), 42- 53. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3352>
- [3] Jiménez, B. (2007). Helminth ova removal from wastewater for agriculture and aquaculture reuse. *Water Science and Technology*, 55(1–2), 485–493. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.046>
- [4] Maya, C., Pérez, M., Velásquez, G., Barrios, J. A., Román, A., & Jiménez, B. (2019). Quick incubation process to determine inactivation of *Ascaris* and *Toxocara* eggs. *Water Science and Technology*, 80(12), 2328–2337. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.062>
- [5] Jimenez-Cisneros, B. E. (2009). Helminth Ova Control in Wastewater and Sludge for Agriculture Reuse. *Water and Health*, 2(Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)).
- [6] Murillo, J., & Peinador, M. (2000). Enteroparásitos : Detección y Vigilancia en Aguas Residuales.
- [7] MINAE. (2007). Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales. 56.
- [8] MINAE. (2015). Reglamento para el Manejo y Disposición Final de Lodos y Biosólidos. *La Gaceta Diario Oficial*.
- [9] Robles, I., Becerra, E., Barrios, J. A., Maya, C., Jiménez, B., Rodríguez-Valadez, F. J., Rivera, F., García-Espinoza, J. D., & Godínez, L. A. (2020). Inactivation of helminth eggs in an electro-Fenton reactor: Towards full electrochemical disinfection of human waste using activated carbon. *Chemosphere*, 250, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126260>
- [10] SEMARNAT. (1997). Normas Oficiales Mexicanas. *Diario Oficial de La Federación*, 65.
- [11] SEMARNAT. (2003). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. *Diario Oficial de La Federación*, 18–61. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=691939&fecha=15/08/2003.
- [12] ECA (2019). Criterios para la Evaluación y Acreditación de Laboratorios Bajo la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017. ECA-MC-C18. Publicado en *La Gaceta* en octubre 2019.
- [13] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023.
- [14] Poder Ejecutivo Costa Rica. (2015). Reglamento para la Calidad del Agua Potable. No 38924-S.