



FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



Trabajo de Fin de Grado – Grado en Biotecnología



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

Estudio de un sistema de potabilización mediante filtros de bio-arena implantado en Benín

Héctor Castañón Cuadrado

Año académico 2016 - 2017



Instituto de Biología
Funcional y Genómica

Tutor:

Francisco del Rey
Instituto de Biología Funcional y Genómica

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Fin de Grado es el resultado de una gran variedad de experiencias ampliamente heterogéneas vividas tras mi paso por la universidad. Mis primeras palabras son, por supuesto, para mi familia. Ellos son y han sido siempre mi más fuerte apoyo, tanto el mi vida profesional como privada, y la razón principal de que haya llegado a donde ahora estoy. Quiero dedicar una mención especial a mi padre, a mi madre y a mi abuelo Gabriel, quienes han aportado su esfuerzo a este proyecto desde el principio y han facilitado que saliera adelante.

Mis más profundos agradecimientos a mi tutor Francisco del Rey, quien siempre ha puesto a disposición todas las facilidades y cariño a su alcance para poder cumplir mis objetivos, de manera altruista incluso cuando no estaba obligado a ello. Ojalá siempre podamos contar con profesores así entre nosotros. A OAN International y a todos sus integrantes, por confiar en mí desde el principio y abrirme camino a esta gran experiencia. A todos los integrantes del equipo de laboratorio del IBFG, así como de los equipos del Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) y del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), de la Universidad de Salamanca, sin cuya colaboración y guía esto no hubiera sido posible.

También a todos mis amigos y a mi pareja, de quienes nunca me ha faltado apoyo y motivación para continuar avanzando, sobre todo cuando las cosas se han puesto cuesta arriba. Por supuesto a la gente de Nikki, con quienes comparto este proyecto, que tan injustamente se ven obligados a sufrir las consecuencias que conlleva vivir en uno de los países más expoliados y desatendidos del mundo, y que aun así son capaces de transmitir la mayor energía y voluntad posible. Y en general a todas las personas anónimas que han colaborado y continúan haciéndolo hasta ahora con este proyecto, y con cualquier otra iniciativa que vuelque sus esfuerzos en hacer de este mundo un lugar más justo y mejor para todos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Abstract | 1 |
| Justificación y antecedentes | 2 |
| Introducción | 5 |
| Objetivos | 13 |
| <i>General</i> | 13 |
| <i>Específicos</i> | 13 |
| Métodos | 14 |
| <i>Instalación del filtro y generación de la capa biológica</i> | 14 |
| <i>Estudios de eliminación de modelos bacterianos</i> | 14 |
| <i>Estudios de eliminación de helmintos parasitarios</i> | 15 |
| <i>Desarrollo de un protocolo para el estudio de eliminación de contaminantes inorgánicos nocivos</i> | 16 |
| Resultados | 17 |
| <i>Instalación del filtro y generación de la capa biológica</i> | 17 |
| <i>Estudios de eliminación de modelos bacterianos</i> | 18 |
| <i>Desarrollo de un protocolo para el estudio de eliminación de contaminantes inorgánicos nocivos</i> | 22 |
| Discusión | 22 |
| Conclusiones..... | 25 |
| Bibliografía | 26 |

ABSTRACT

Over 2000 million people are currently using contaminated water sources, which correlates directly with the growth of infectious diseases and poisoning through the consumption of noxious chemical substances. Many implications can be seen as a result of this, including a lower quality of life and increases in the cost of health care. The aforementioned factors greatly affect the development of these societies. This project implements the introduction of bio-sand filters in the Nikki commune, north of Benin. The filters are produced with local materials, allowing for ease of access to the resources required and cost efficiency, and offer great results for the regeneration of contaminated water. The objective of this research has been to characterize the elimination capacity of certain pathogens by this method. The studied pathogens are linked with the most dangerous and prevalent infectious diseases transmitted through the ingestion of contaminated water widespread throughout the country. Selected contaminant agents were fecal bacteria, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* as well as several parasitic helminths species and various inorganic chemical materials. During these laboratory studies, average reductions of 95-100% of some of these contaminants were found, allowing for the deduction of the purification potential of the proposed system. Further, new studies will be necessary to determine the extraction capacity of dissolved inorganic chemicals in water.

JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

El agua es uno de los recursos naturales fundamentales y en la actualidad no existe duda alguna de la importancia tanto de la cantidad como de la calidad de la misma para el bienestar y el desarrollo humano. Se necesitan entre 50 y 100 litros/persona diarios para cubrir cómodamente todas las necesidades de consumo e higiene, estando el mínimo necesario alrededor de los 25. En 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente el derecho humano al abastecimiento de agua dulce. *Todas las personas tienen derecho a disponer de forma continuada de agua suficiente, salubre, físicamente accesible, asequible y de una calidad aceptable, para uso personal y doméstico* (ONU, 2010). Se trata de un recurso abundante y renovable, sin embargo, aún en la actualidad existe una gran cantidad de personas que no disponen de acceso suficiente a agua apropiada para su consumo. La contaminación del agua es el grado de impureza, que habiendo variado sus propiedades químicas, físicas o biológicas, puede generar efectos adversos en la salud de las personas.

El agua contaminada y el saneamiento deficiente están relacionados con la transmisión de enfermedades infecciosas o parasitarias, además de con intoxicaciones con químicos nocivos para la salud. Los servicios de agua y saneamiento inexistentes, insuficientes o gestionados de forma inapropiada conllevan que el agua que beben cientos de millones de personas se vea peligrosamente contaminada o polucionada químicamente. Se estima que alrededor de 663 millones de personas se abastecen de fuentes de agua no mejoradas (Figura 1). De ellas, 159 millones dependen de aguas superficiales, siendo estas las más propensas a contener contaminantes peligrosos. Según la Dra. María Neira, Directora del



Figura 1. Porcentaje de población con acceso a fuentes mejoradas de agua potable por países (OMS, 2015).

Departamento de Salud Pública y Determinantes Ambientales y Sociales de la Salud de la OMS al menos 2000 millones de personas en el mundo se abastecen de una fuente de agua potable que está contaminada por heces (OMS, 2017). Además, se calcula que en el año 2025, la mitad de la población mundial vivirá en zonas con escasez de agua (OMS, 2016).

Han de tenerse en cuenta también las facilidades de acceso a agua de los sectores de mayor peligrosidad como niños, enfermos o mujeres embarazadas. Esto es especialmente preocupante en el caso de los centros sanitarios y escuelas, sobre los que se estima que hasta 5 de cada 10 centros de algunas zonas en vías de desarrollo carecen de instalaciones básicas de agua, saneamiento e higiene (OMS, 2017). En los centros sanitarios tanto los pacientes como los profesionales quedan expuestos a mayores riesgos de infección y enfermedad cuando no existen servicios de suministro de agua, saneamiento e higiene. A nivel mundial, el 15% de los pacientes contraen infecciones durante la hospitalización. En los países de ingresos bajos y medios, el 38% de los centros sanitarios carecen de fuentes de agua, el 19% de saneamiento mejorado, y el 35% de agua y jabón para lavarse las manos. Se calcula que unos 2,4 billones de personas se ven al año afectadas por enfermedades diarreicas (Vos T et al., 2016)⁽²⁸⁾. Cerca de 842000 personas mueren cada año por enfermedades diarreicas como consecuencia directa de la insalubridad del agua. Tratándose estas de enfermedades fácilmente prevenibles, la muerte anual de unos 361000 niños menores de cinco años se podría evitar si se eliminaran estos factores de riesgo, siendo esta la tercera causa de muerte en menores de 5 años a nivel mundial. Además, unos 161 millones de niños sufren retraso del crecimiento o malnutrición crónica, vinculado con la falta de agua, saneamiento e higiene, y en particular con contaminaciones derivadas de la defecación al aire libre. La diarrea es la enfermedad más conocida en relación con el consumo de alimentos o agua contaminados. Sin embargo, existen otros factores de aún mayor peligrosidad; más de 1500 millones de personas al año se ven afectadas por esquistosomiasis, parasitosis intestinales, helmintiasis, tracoma y otras enfermedades parasitarias transmitidas al agua por diversos vectores, que pueden ser crónicas y de alta gravedad en regiones en desarrollo y sin acceso a tratamientos efectivos (Datos y cifras mostrados por el centro de prensa de la OMS, en noviembre de 2016).

Además de las consecuencias sanitarias directas, estos hechos conllevan también fuertes consecuencias económicas y sociales. Tener un buen acceso a fuentes de abastecimiento mejoradas permite a las personas gastar menos tiempo y esfuerzos en recogerla físicamente, lo que significa que pueden ser productivos en otras esferas, haciendo especial hincapié en los sectores más desfavorecidos por la situación, que son los que suelen cargar con la responsabilidad de la recogida de agua: las mujeres

(lo que agrava las situaciones de desigualdad) y los niños (influyendo drásticamente en su educación). La reducción de los perjuicios generados por el consumo de agua contaminada, vendría también acompañada por una reducción del gasto sanitario ya que las personas tendrían menos probabilidades de enfermar y de incurrir en gastos médicos.

Los datos revelan que la mayor parte de la población sin acceso a agua potable en el entorno mundial se sitúa en África subsahariana, con 319 millones de personas, de las que 8 de cada 10 viven en zonas rurales con escaso acceso a nuevos recursos (Informe de evaluación del acceso a agua potable, OMS, año 2015). Un claro ejemplo de esta carencia es que pese a que la adopción de prácticas de higiene básicas por parte de las parteras puede reducir el riesgo de infecciones, septicemia y muerte en madres y lactantes hasta en un 25%, en África el 42% de los centros de salud no tienen acceso a una fuente mejorada de agua a menos de 500 metros, y carecen incluso de instalaciones básicas de agua y saneamiento. Con el fin de atenuar el impacto de este problema en los núcleos poblacionales, muchas organizaciones llevan a cabo proyectos que buscan el acercamiento de una fuente fiable de agua apropiada para el consumo a aquellos que aún no la poseen. En mi caso y a través de este Trabajo de Fin de Grado, he desarrollado un proyecto que consiste en la construcción, distribución e implementación de filtros de bio-arena en la región de Nikki en el país de Benín, a través de la colaboración con un centro de constructores local. El sistema de filtración se basa en un modelo de filtros de arena biológicos individuales, que operan de manera intermitente, creado por la firma canadiense CAWST®. Estos filtros pueden producirse en cadena, a costes muy bajos y con materiales locales, lo que hace de este sistema una técnica idónea para obtener agua potable en zonas aisladas con escasez de recursos, como las zonas rurales de gran parte de África subsahariana.

INTRODUCCIÓN

El filtro de bio-arena es una adaptación de los filtros de arena lentos tradicionales, con un diseño más pequeño adaptado para darle un uso continuo e individual. Se clasifica dentro de las denominadas técnicas “point of use”, destinadas a purificar el agua en el punto y momento de su uso. El filtro (Figura 2) consta de una estructura externa, que sirve de recipiente para las diversas capas de grava y arena que se emplean para el filtrado, esta estructura tiene un agujero en su parte inferior con una manguera de salida en forma de “U” invertida, que asciende hasta 5 cm por encima del nivel de la arena de filtración, permitiendo que el filtro se mantenga siempre lleno de agua tras su uso. En el interior de esta estructura se encuentran tres capas de grava y arena de diferentes grosores. En los primeros 5 cm empezando por la base se dispone la grava de drenaje (de 6 a 12 mm de grosor) que sostiene la capa de grava usada para separar y ayuda a que el agua fluya hacia el tubo de salida. Los siguientes 5 cm se componen de grava de separación (de 1 a 6 mm de grosor), que sostiene la arena de filtración y evita que vaya hacia la capa de drenaje y el tubo de salida pudiendo taponarlo. Finalmente en la parte superior hay 54’3 cm de arena de filtración (arena $\leq 0’7$ mm de grosor), que es la capa encargada de extraer los patógenos y los sólidos suspendidos. Cubriendo la arena de filtración hay otra pequeña estructura denominada caja difusora, que recoge el agua vertida dentro del filtro para que fluya de manera suave hacia el interior, esta caja difusora tiene capacidad de alojar 12 L de agua, que será la carga máxima del filtro. Este diseño le confiere la característica de generar la denominada capa biológica o biocapa: una capa que se desarrolla en los 5-10 cm superiores de la superficie de arena que mejora la eficacia del filtrado, siendo el componente clave del filtro que retira los patógenos. Los patógenos y los sólidos suspendidos se eliminan a través de la combinación de procesos biológicos y químicos que se dan tanto en la biocapa como dentro de la capa de arena de filtración. Estos procesos incluyen: entrapamiento mecánico (los sólidos suspendidos y los patógenos quedan

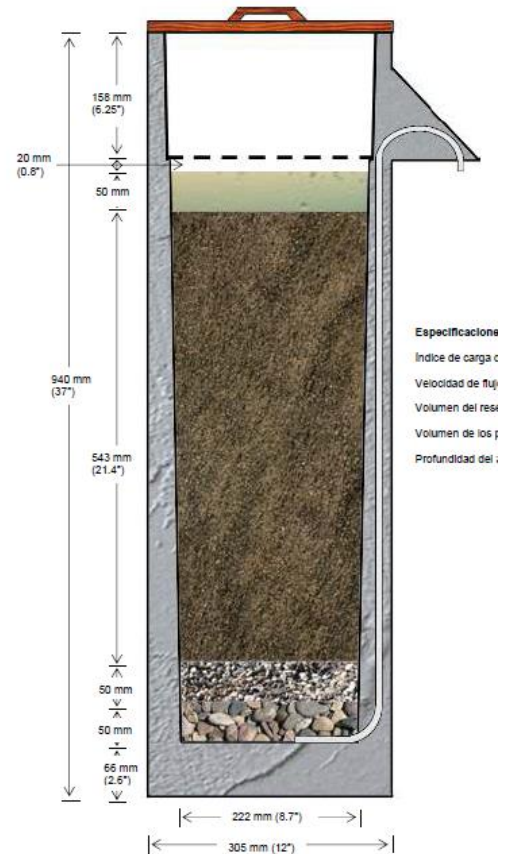


Figura 2. Diseño y medidas del filtro de bio-arena desarrollado por CAWST®.

físicamente atrapados en los espacios existentes entre los granos de arena), depredación (los patógenos son consumidos por otros microorganismos que se encuentran en la biocapa), adsorción (los patógenos se adhieren entre ellos, a los sólidos suspendidos que se encuentran en el agua y a los granos de arena) y muerte natural (los patógenos terminan su ciclo de vida o mueren antes de salir del filtro, porque no tienen suficientes nutrientes u oxígeno para su supervivencia). El empleo de este filtro se lleva a cabo de manera intermitente debido a su característico funcionamiento. El reservorio tiene capacidad de alojar 12 L de agua, una vez filtrados, debe esperarse un periodo de pausa de mínimo 1 h, y máximo 48 h. Pasadas las 48 h la biocapa puede comenzar a perder eficacia debido al estrés generado por la falta de oxígeno y nutrientes, cuyos niveles se restauran con cada nueva carga de agua.

Existen algunos datos publicados de la eficacia del filtro de bio-arena para extraer algunos patógenos presentes en agua. Se ha documentado hasta un 99% de eliminación de quistes de *Giardia* y oocistos de *Cryptosporidium* (Palmateer et al., 1999)⁽²⁾ y hasta un 99% de eliminación de *Escherichia coli* (*E. coli*) en experiencias de laboratorio con columnas de bio-arena a bajas concentraciones (Elliot et al., 2015)⁽³⁾. No obstante sería conveniente estudiar la capacidad de acabar específicamente con algunos de los contaminantes y patógenos más incidentes y peligrosos que pueden encontrarse en las áreas a las que se destina este tipo de técnica. En la actualidad, las principales enfermedades infecciosas transmitidas por el agua en África subsahariana, así como en otras áreas en desarrollo, comprenden el cólera, la poliomielitis, la fiebre tifoidea y diversas infecciones parasitarias, que varían dependiendo de la zona en cuestión. Además, encontramos otra serie de afecciones derivadas del consumo de agua contaminada por químicos tóxicos que provienen tanto de posibles metabolitos bacterianos propios del ecosistema, como de actividades humanas que implican el contacto directo o indirecto con el agua, como los vertidos de residuos procedentes de actividades mineras.

Entre las principales enfermedades infecciosas generadas por bacterias encontramos las enfermedades diarreicas, el cólera y la fiebre tifoidea, estando las dos últimas recogidas entre las vacunas recomendadas para cualquier viajero a Benín (Asociación Española de Vacunología, 2008). Se calcula que las enfermedades gastrointestinales causan más muertes a nivel mundial que el VIH, la malaria y el sarampión juntos (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2012). Más de 842000 personas mueren cada año como consecuencia directa de la insalubridad del agua, en la mayoría de ocasiones esto es debido a contaminaciones por coliformes provenientes de la defecación al aire libre (Ashbolt et al., 2004)⁽⁴⁾, dándose la mayoría de estos casos en áreas en vías de desarrollo, debido a la falta de recursos y tratamientos. Se conoce que alrededor del 88% de las muertes asociadas a enfermedades diarreicas son

atribuibles al consumo o uso de agua contaminada (Ashbolt et al., 2004; Liu et al., 2012)^(4, 5). Estudios publicados muestran grandes reducciones en la incidencia de enfermedades diarreicas con la mejora de las condiciones biosanitarias del agua empleada por la población. Los datos muestran disminuciones de hasta el 68% en la incidencia de estas enfermedades, y de hasta entre 30-40% en los ratios de mortalidad de las mismas (Esrey et al., 1985)⁽¹⁾. El mejor y más común modelo empleado para emular la contaminación con bacterias de origen fecal es la especie *E. coli* (Ashbolt et al., 2004; Stauber et al., 2006)^(4, 6) (Figura 3). La diarrea producida por cepas patógenas de *E. coli* es una causa importante de muerte en niños menores de 5 años, especialmente en las regiones de África subsahariana y Asia del Sur donde es una de las cuatro causas más importantes de diarrea moderada y severa, potencialmente letales en esos ambientes (OMS, 2016).

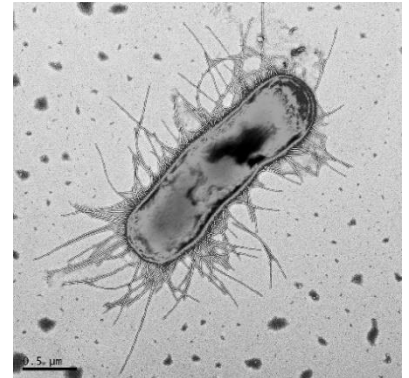


Figura 3. Imagen de *E. coli* (Revista de la facultad de ciencias de la salud universidad de Washington)

El cólera, según la OMS, es una enfermedad diarreica aguda del intestino delgado causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados con los serotipos patógenos del bacilo *Vibrio cholerae* (Figura 4), que se manifiesta entre 12 horas y 5 días tras la ingestión. Estas bacterias se introducen entre las células del epitelio y secretan una toxina que inhibe algunas bombas de electrolitos, por lo que hay



Figura 4. Imagen de *Vibrio cholerae*. (Facultad de ciencias biológicas de la Universidad de Praga).

una pérdida de sodio, potasio y cloruro de la célula hacia la luz del intestino. Como reacción a esta pérdida de electrolitos las células intestinales secretan altas cantidades de agua, lo que da lugar a fuertes diarreas con altas concentraciones de electrolitos y bajas concentraciones proteicas. Si no se trata, a menudo (20% de los casos) causa deshidratación, conduce al colapso circulatorio y puede causar la muerte en cuestión de horas (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica “ANMAT”, 2011). El ácido clorhídrico del estómago representa

una barrera defensiva eficaz, y una gran parte de los patógenos son así aniquilados, por tanto, la dosis infectante debe ser relativamente alta para llegar a una infección (Dobosch et al., 1995)⁽⁷⁾. En caso de ser ingerido en agua, esta dosis ronda el millón de microorganismos, aunque varía dependiendo del individuo. Si se recibe el tratamiento adecuado solamente se manifiestan síntomas leves que pueden solucionarse mediante rehidratación oral. Los investigadores calculan que cada año hay en el mundo

entre 1,3 y 4 millones de casos de cólera, y entre 21 000 y 143 000 defunciones por esta causa (OMS, 2016). Por ello, el cólera se sigue considerando una amenaza mundial para la salud pública y un indicador de inequidad y falta de desarrollo social. África sigue siendo el continente más afectado por esta enfermedad, con epidemias periódicas (De Mangi et al, 2007)⁽⁸⁾ y un total de 71 176 casos reportados en 2015, incluyendo 937 muertes, teniendo además en cuenta el alto número de casos que se dan en las zonas rurales aisladas que no se reportan, imposible de estimar (Cholera anual report OMS, 2016)⁽⁹⁾. La enfermedad sigue considerándose endémica en Benín (Gaffga et al., 2007)⁽¹⁰⁾ (Figura 5), habiendo sufrido una fuerte epidemia el pasado año (OMS, 2017). Gran parte de los estudios sobre este patógeno pueden realizarse empleando modelos no infectivos, como otras especies de *Vibrio*, que poseen características similares.

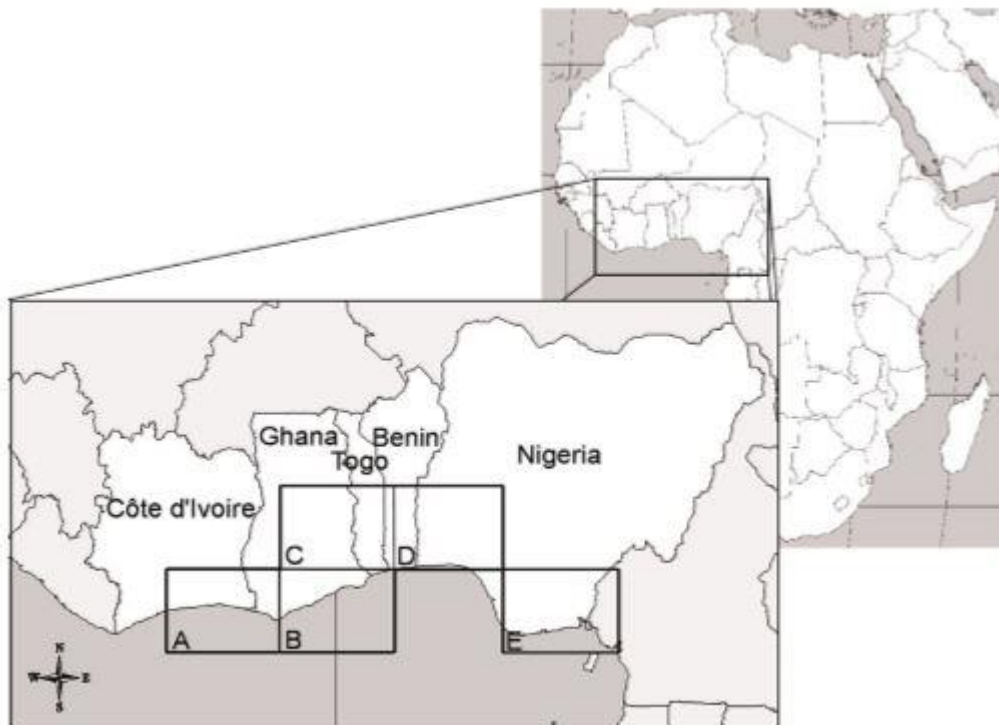


Figura 5. Áreas endémicas del cólera en África subsahariana. (De Mangi et al., 2006)⁽⁸⁾

Por su parte, la fiebre tifoidea o fiebre entérica es una enfermedad bacteriana causada por *Salmonella entérica* serotipo *typhi* (*S. typhi*) (Figura 6). Existen otras enfermedades menos graves generadas por bacterias de esta especie, como es el caso de la salmonelosis, causada por *Salmonella entérica* serotipo *paratyphi* (*S. paratyphi*). Las bacterias del género *Salmonella* se transmiten por la ingestión de alimentos o bebidas que contengan la bacteria, generalmente contaminadas por heces u orina de personas infectadas. Entre los síntomas de la fiebre tifoidea destacan fiebre, malestar, cefaleas y fuertes diarreas, e incluso inflamación del hígado y el bazo (OMS, 2015), suelen aparecer entre 1 y 3

semanas después de la exposición y pueden ser leves o graves. La enfermedad es tratable con antibióticos, aunque la resistencia a los medicamentos más habituales está generalizada. Habitualmente los brotes suelen darse en regiones hiperpobladas y empobrecidas con saneamiento inadecuado, que se encuentran expuestas a agua y alimentos contaminados, por lo que suele ser una enfermedad característica de regiones en vías de desarrollo (Crump et al., 2010)⁽¹¹⁾.

En el año 2000, las fiebres entéricas afectaron a más de 27 millones de personas, causando alrededor de 217 000 muertes, dándose la mayoría de estos casos en regiones del sur de Asia y África subsahariana (Crump et al., 2004)⁽¹²⁾. Los brotes de fiebre tifoidea son frecuentes en el África subsahariana, a menudo con un gran número de pacientes presentando perforaciones intestinales, con riesgo de muerte por la falta de recursos y tratamiento. Por desgracia, debido a la falta de recursos y organización, es complicado caracterizar completamente la epidemiología de la enfermedad en la zona (Muyembe-Tamfum et al., 2009)⁽¹³⁾. El estudio de los patógenos causantes de fiebres entéricas se puede realizar a través de especies de *Salmonella* no patógenas, ampliamente distribuidas en el campo de la investigación microbiológica. Este hecho ofrece la ventaja de poder extrapolar los resultados a otras enfermedades de menor gravedad, pero también ampliamente extendidas, causadas por otras especies del género *Salmonella*, como la salmonelosis no tifoidea, una de las enfermedades de transmisión alimentaria más extendidas del mundo, y que puede ser causada por más de 2 500 cepas diferentes. Se estima que esta enfermedad afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones (OMS, 2013).

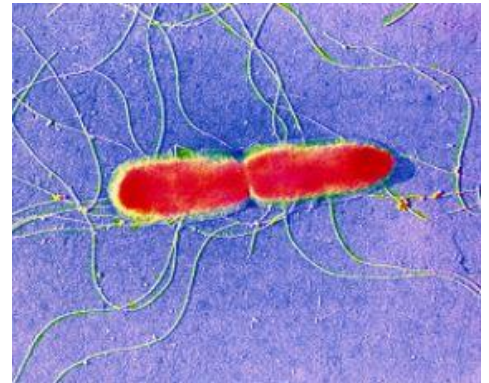


Figura 6. Imagen de *Salmonella typhi*. (Wain, J., Escuela médica de Norwich, Universidad de Anglia del Este, Norwich (UK)).

Atendiendo a las infecciones parasitarias, la esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria aguda y crónica causada por trematodos del género *Schistosoma* (OMS, 2017) que, dependiendo la especie concreta que cause la infección, dará unos u otros síntomas. En concreto, África subsahariana es la zona por la que esta enfermedad se encuentra más extendida, predominando las especies *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium*, causante de las esquistosomiasis intestinal y urinaria respectivamente, endémicas de la zona (Chitsulo et al., 2000)⁽¹⁴⁾, mientras



Figura 7. Cercaria de *Schistosoma mansoni*.

que en extremo oriente se encuentra *Schistosoma japonicum*, causante de otra variante de la esquistosomiasis intestinal. En general, estas especies se encuentran de manera habitual en regiones rurales en desarrollo de Asia y Sudamérica (King et al., 2005)⁽²⁰⁾. La infección se da por las formas larvarias del parásito, denominadas cercarias (de unos 200 µm), liberadas por caracoles de agua dulce infectados, que penetran en la piel durante el contacto con aguas contaminadas (Figura 7).

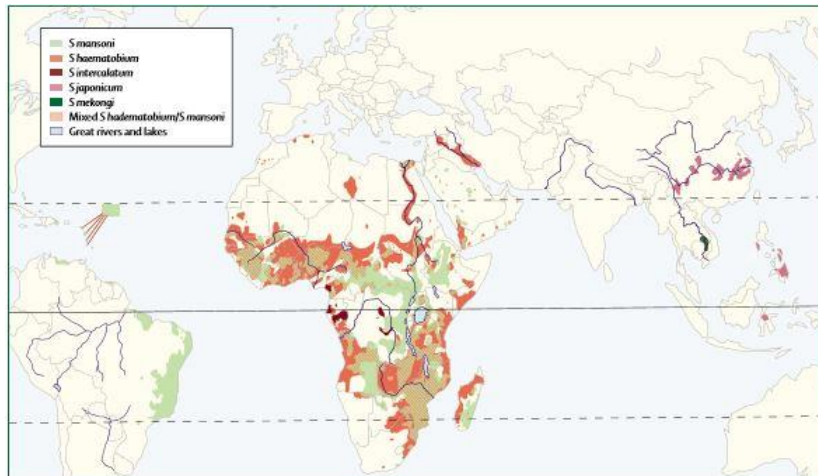


Figura 8. Distribución global de las diversas especies de *Schistosoma*. (Gryseels et al., 2006)⁽¹⁵⁾

Estas cercarias se convierten en esquistosómulas, que migran al pulmón, vena pulmonar o vena porta. En el interior del organismo, las parejas de adultos (de 7 a 20 mm de longitud) de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* se alojan en los vasos sanguíneos mesentéricos mientras que *Schistosoma haematobium* se asienta en las venas de la vejiga urinaria. En estas localizaciones es donde las hembras ponen sus huevos (de cientos a miles al día) (Gryseels et al., 2006)⁽¹⁵⁾, que han de atravesar las paredes bien del intestino o bien de la vejiga urinaria para poder salir al exterior con las heces o la orina. Una vez en el exterior, eclosionará y liberará el miracidio (siguiente etapa vital) en el agua. Este buscará un caracol acuático (hospedador intermediario) donde se producen las fases de esporocisto I y II dentro del cual se forma la fase infectiva. Los huevos que quedan atrapados en los tejidos (pared intestinal o vejiga, hígado...), causan una reacción inmunitaria intensa formando granulomas que progresivamente inducen hepatoesplenomegalia entre otros signos y síntomas (Cooke et al., 1999)⁽¹⁶⁾. Los síntomas generales son fiebre, fatiga, malestar general, tos, eosinofilia e infiltrados en el tórax, además de la posible infección e infiltración abdominal (Gryseels et al., 2006)⁽¹⁵⁾. Afecta principalmente a las comunidades pobres y rurales, en particular a niños y personas que realizan tareas domésticas, agrícolas y forestales, con más probabilidad de entrar en contacto con aguas contaminadas.

Se estima que en la actualidad hay más de 200 millones de personas infectadas y alrededor de 600 millones de personas en riesgo de contagio, de las que más del 85% se encuentran en África subsahariana (Lengeler et al., 2003; Chitsulo et al., 2000; Crompton et al., 1999)^(14, 17, 19) (Figura 8), ascendiendo el número de muertes generadas por este patógeno a 14 000 al año y pérdidas económicas de 1 532 millones al año, de las que el 77% se dan en África subsahariana (Gryseels et al., 2006)⁽¹⁵⁾. Una de las principales vías de control de la enfermedad es el tratamiento del agua destinada para el consumo humano para evitar el contagio. Debido al nivel de complicación para hacer llegar el tratamiento a las zonas endémicas, y a la falta de medidas efectivas para acabar con la enfermedad en áreas en vías de desarrollo, el mejor procedimiento que se puede emplear en la actualidad para acabar con la misma es la prevención (Gryseels et al., 2006; Van der Werf et al., 2003)^(15, 18).

Otra enfermedad parasitaria a tener en cuenta es la estrongiloidosis. Se trata de una helmintiasis causada por parásitos del género *Strongyloides*, casi en la totalidad de los casos por la especie *Strongyloides stercoralis* (Ruano et al., 2005)⁽²¹⁾. Está clasificada dentro de las Parasitosis Desatendidas Tropicales por la OMS (Kaminsky et al., 2011)⁽²²⁾. La infección se da cuando las denominadas larvas filariformes infectivas (fase larvaria L3) se introducen en el huésped a través de



Figura 9. Larvas de *Strongyloides venezuelensis* en fase L3.

la piel (Figura 9). Estas pasan a través del tejido conjuntivo subcutáneo, ingresando en un capilar venoso y migrando por el torrente circulatorio hacia el corazón y pulmones, atravesando sus capilares y alvéolos, donde mudan al siguiente estado larvario. Tras ello ascienden por el árbol bronquial, ayudadas por el mecanismo de expulsión de los cilios, hasta llegar a la tráquea, laringe y faringe, desde donde se introducen al sistema digestivo y alcanzan su madurez sexual en los túneles de la submucosa del intestino delgado. Aquí las hembras partenogénicas depositan sus huevos, que eclosionan rápidamente liberando las larvas de primer estadio (L1) que saldrán al exterior con las heces. Algunas de estas larvas pueden transformarse dentro del propio intestino al estado infectivo posibilitando la autoinfección, introduciéndose de nuevo en el hospedador a través de la mucosa del colon (Ruano et al., 2005)⁽²¹⁾.

La mayoría de las personas infectadas por este parásito permanecen asintomáticas durante años, aunque presentando eosinofilia en cerca de un 80% de los casos. Este hecho permite que el parásito

realice su ciclo en el hospedador durante largos periodos de tiempo. Los posibles síntomas causados por esta enfermedad son lesiones cutáneas, infiltraciones pulmonares y síntomas intestinales inespecíficos como diarreas o dolores (Ruano et al., 2005)⁽²¹⁾. Un problema añadido es la alta dificultad para el diagnóstico en condiciones de falta de medios. Este se realiza mediante la detección de larvas en heces o fluido duodenal, pero puede requerir de tests avanzados, ya que la simple observación de las heces ofrece falsos negativos hasta en el 70% de los casos (Ruano et al., 2005)⁽²¹⁾. Afecta en su mayoría a países tropicales y subtropicales con malas condiciones para el saneamiento y abastecimiento de agua. Se estima que entre ochenta y cien millones de personas que habitan zonas templadas del planeta se encuentran infectadas en la actualidad (Ruano et al., 2005)⁽²⁵⁾. De ellas, una gran cantidad se encuentran en zonas rurales de África subsahariana (Jorgensen et al., 1996)⁽²³⁾, donde se encuentran muchos países endémicos con prevalencias de hasta el 48%. No obstante, las cifras exactas son realmente complicadas de estimar, ya que una gran cantidad de los casos de países en vías de desarrollo quedan sin reportar debido a la falta de recursos de comunicación y diagnóstico, sobre todo en zonas rurales de estas áreas (Genta, R. M., 1989)⁽²⁴⁾.

Finalmente, la contaminación de las aguas por químicos inorgánicos nocivos como metales pesados puede alcanzar niveles que afectan profundamente a la salud de la población en áreas en desarrollo. En muchas de ellas, actividades como la explotación minera, la metalurgia, las actividades de fabricación, reciclaje o uso persistente de pinturas y gasolinas, gestionadas de manera inadecuada, generan altos niveles de contaminación ambiental por estos metales así como por otros tóxicos (OMS, 2016). Algunos, como pueden ser el plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), níquel (Ni), cobre (Cu) o cromo (Cr), así como otros químicos inorgánicos nocivos como el arsénico (As), pueden encontrarse en diversas zonas de África subsahariana, hecho que pone en alto riesgo a las poblaciones locales por peligro de envenenamiento por estos compuestos (Biney et al., 1994)⁽²⁵⁾. Existen antecedentes de casos de microorganismos capaces de extraer o transformar químicos inorgánicos presentes en suelos y aguas (Ambiental I., 2003)⁽²⁶⁾, por lo que no se debe descartar la capacidad de poder reducir su presencia en agua mediante el empleo de filtros de estas características, ya que disponen de un muy variado biofilm. En la actualidad no existe información alguna publicada en relación a la extracción de estos contaminantes empleando el sistema propuesto. Considerando esta información, el propósito de esta investigación es determinar la capacidad de eliminación de los agentes causantes de estas enfermedades en humanos mediante el empleo del modelo propuesto de filtro de bio-arena, así como el estado del agua necesario para poder ser potabilizada utilizando este sistema y las posibles mejoras a realizar en el mismo.

OBJETIVOS

General

Determinar la capacidad de regeneración del agua contaminada con los agentes causantes de algunas de las enfermedades transmitidas por el agua más graves e incidentes en áreas en vías de desarrollo, mediante el empleo de un modelo propuesto de filtro de bio-arena.

Específicos

Determinar la capacidad de eliminación empleando un modelo propuesto de filtro de bio-arena de:

- Turbidez y organismos macroscópicos.
- Bacterias fecales coliformes, representadas por el modelo *Escherichia coli*.
- *Vibrio cholerae*, patógeno causante del cólera, representado por el modelo *Vibrio alginolyticus*.
- *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, patógenos causantes de la fiebre tifoidea y la salmonelosis, representadas por el modelo *Salmonella typhimurium*.
- Las diferentes especies de *Schistosoma*, causantes de las diferentes variantes de la esquistosomiasis, representadas por el modelo *Schistosoma mansoni*.
- Las diferentes especies de *Strongyloides*, en particular *Strongyloides stercoralis*, causantes de las diferentes variantes de la estrogiloidosis, representadas por el modelo *Strongyloides venezuelensis*.
- Desarrollar un protocolo para valorar la capacidad de eliminación de contaminantes químicos inorgánicos nocivos, causantes de envenenamientos por consumo de agua contaminada por estos compuestos.

MÉTODOS

Instalación del filtro y generación de la capa biológica

Se instaló un filtro de las características y dimensiones previamente indicadas construido en acero inoxidable (Figura 10) en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), atendiendo a las instrucciones que se ofrecen en el manual de instalación y operación de filtros de bio-arena amablemente proporcionado por CAWST® (CAWST®, 2009). El desarrollo de la biocapa se produce de manera natural, alimentando el filtro con agua poblada con microorganismos durante un periodo de 3 a 5 semanas a intervalos de mínimo 1 y máximo 48 horas. Para ello se empleó agua recogida en el río Tormes (Salamanca) de manera periódica, renovada semanalmente. El agua empleada estaba levemente turbia y contenía tanto insectos como otros organismos macroscópicos.



Figura 10. Filtro de bio-arena instalado en el IBFG, construido en acero inoxidable.

Estudios de eliminación de modelos bacterianos

Se emplearon modelos bacterianos no patógenos que emulan las características de los patógenos naturales. Los modelos empleados fueron los siguientes:

- Como modelo de bacteria fecal coliforme se utilizó *Escherichia coli* (cepa FRI-6, colección IBFG CSIC/USAL).
- Para representar al patógeno *Vibrio cholerae*, causante del cólera, se utilizó *Vibrio alginolyticus* (cepa FRI-58, colección IBFG CSIC/USAL).
- Como modelo representante de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, causantes de la fiebre tifoidea y la salmonelosis, se empleó *Salmonella typhimurium* (cepa SV4899), transformada para conferirle resistencia al antibiótico kanamicina (kan), amablemente proporcionada por el Dr. Josep Casadesús de la Universidad de Sevilla.

Se prepararon suspensiones puras de concentración conocida a partir de cultivos de los diversos modelos presentados, de las que se recogieron muestras. Para ello se generaron cultivos de los mismos con una densidad óptica (D.O.) conocida a partir de un cultivo inicial en medio de cultivo LB, cuya

concentración aproximada fue titulada. Conociendo esa información, pudieron reproducirse tantos cultivos como fueran necesarios a partir de un cultivo inicial de cada microorganismo en cuestión. Las distintas suspensiones preparadas se filtraron a través del filtro de bio-arena maduro previamente instalado. Se realizaron dos cargas del filtro consecutivas con cada una de las soluciones: una inicial de 15 L para desplazar el volumen muerto de líquido del interior del filtro (12 L), y una segunda de 10 L tras 1 h de espera, recogiendo muestras de la corriente de salida (Protocolo detallado en “Anexos II. Protocolos”). La concentración de microorganismos de las muestras recogidas fue determinada mediante el método de recuento en placa. Para ello se emplearon placas de cultivo de 20 mL con medios sólidos que garantizaran presión selectiva, lo que asegura que las bacterias crecidas en ellos equivalen a las introducidas con la solución de alimentación del filtro. Se emplearon los medios EMB para *E. coli*, medio TCBS para *Vibrio alginolyticus* y agar Mac Conkey + kan para *Salmonella typhimurium* (Composición de los medios detallada en “Anexos II. Protocolos”).

Estudios de eliminación de helmintos parasitarios

Debido al enfoque multidisciplinar de esta investigación y al nivel de seguridad requerido para trabajar con estos organismos, estos experimentos se llevaron a cabo con la colaboración y en las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la USAL. Se preparó e instaló una construcción de una columna de filtración utilizando una probeta de plástico de 1L de volumen, en la que se colocaron las gravas de drenaje y separación, así como la misma arena de filtración utilizada en el filtro original, con la misma colocación y proporciones (Figura 11). Se calcularon las proporciones necesarias tanto de los elementos de filtración como del volumen muerto contenido en su interior como del reservorio de agua. El caudal se controló empleando una llave acoplada al tubo de salida, fijando un caudal de 0'25 L/m. Se realizó un montaje con la columna y un embudo para verter la alimentación de un modo seguro, y de tal manera que la corriente de salida se recogiera en copas de sedimentación (Figura 12). Este modelo a escala carecía de la característica de la capa biológica, por lo que el factor valorado es la capacidad de filtración de la arena empleada para eliminar los diversos nematodos parasitarios.

Se prepararon suspensiones de concentración estimada con cercarias de *Schistosoma mansoni* y larvas filariformes de *Strongyloides venezuelensis*. Se filtró un volumen de 0'35 L, cargando la columna dos veces consecutivas con un periodo de pausa de 1 h entre ambas cargas. Se recogieron muestras de la corriente de alimentación a lo largo de ambas cargas, y toda la corriente de salida se almacenó en copas

de sedimentación. Se midió la concentración de la corriente de alimentación y se realizó el conteo de todos los parásitos presentes en la corriente de salida mediante recuento directo, empleando una lupa de laboratorio SZX9 Olympus® (Protocolo detallado en “Anexos II. Protocolos”).



a)



b)

a) Figura 11. Columna de filtración construida con una probeta de plástico ($V=1L$), con gravas de drenaje, de separación y arena de filtración empacadas.

b) Figura 12. Montaje del modelo a escala para el estudio del filtrado de soluciones con nematodos parasitarios.

Desarrollo de un protocolo para el estudio de eliminación de contaminantes inorgánicos nocivos

Los experimentos fueron planificados con la colaboración del equipo del Centro de Investigación Desarrollo Tecnológico del Agua de la USAL (CIDTA). Se prepararon soluciones puras de diversos compuestos de As, Pb, Hg, Cd, Ni, Cu y Cr. Las soluciones se prepararon a concentraciones 10 veces mayores que las permitidas en agua potable por la legislación europea (Tabla 1).

Los siguientes compuestos fueron amablemente suministrados por el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Químicas de la USAL así como por el CIDTA, para generar las soluciones de alimentación:

- As: Arsenito de sodio SIGMA-ALDRICH®.
- Pb: Nitrato de plomo II Applichem®.
- Hg: Cloruro mercuríco PROBUS®.
- Cd: Nitrato de cadmio tetrahidratado Alfa Aesar®.
- Ni: Nitrato de níquel II hexahidratado PANREAC S.A.®.
- Cu: Nitrato de cobre II trihidratado SIGMA-ALDRICH®.
- Cr: Cromato de sodio tetrahidratado ALDRICH®.

Las distintas soluciones preparadas se filtraron a través del filtro de bio-arena maduro previamente instalado. Se realizaron para esto diversas cargas del filtro recogiendo muestras de la corriente de salida. La concentración de contaminante en las muestras recogidas fue determinada mediante el método de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo por el Servicio de Análisis de la Facultad de Químicas de la Universidad de Salamanca (USAL).

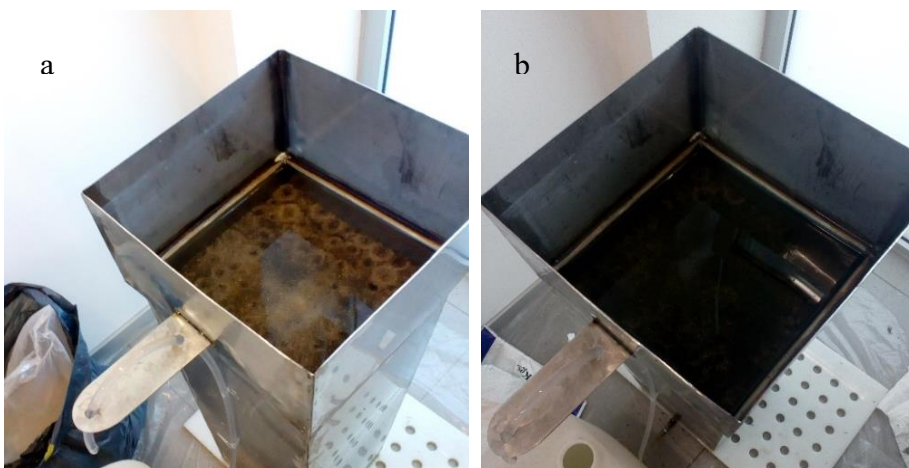
| | <i>As</i> | <i>Pb</i> | <i>Hg</i> | <i>Cd</i> | <i>Ni</i> | <i>Cu</i> | <i>Cr</i> |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Niveles máximos permitidos (mg/L)</i> | 0,01 | 0'01 | 0'001 | 0'003 | 0'02 | 2 | 0'05 |
| <i>Concentración de la solución de alimentación (mg/L)</i> | 0,1 | 0'1 | 0'01 | 0'03 | 0'2 | 20 | 0'5 |

Tabla 1. Máximas concentraciones de los diversos contaminantes inorgánicos empleados permitidas en agua potable por la legislación europea (Alonso, Alberto, 2014)⁽²⁷⁾, y concentraciones empleadas en la solución de alimentación.

RESULTADOS

Instalación del filtro y generación de la capa biológica

El filtro de bio-arena fue instalado, ofreciendo un caudal máximo de 0'45 L/m y un caudal medio de 0'35 L/m y una corriente de salida completamente clarificada (Figura 13). La biocapa se desarrolló hasta estabilizarse alrededor de la cuarta o quinta semana, su evolución puede apreciarse en el cambio progresivo de la comunidad biológica formada en la superficie de la arena de filtración (Figura 14). Se observó una clarificación completa del agua en la corriente de salida, así como un 100% de retención de cualquier organismo macroscópico presente en la corriente de alimentación.



a) Figura 13. Superficie de la arena de filtración tras la segunda semana de uso.

b) Figura 14. Superficie de la arena de filtración tras la quinta semana de uso.

Estudios de eliminación de modelos bacterianos

Como se ha mencionado anteriormente, se analizó la capacidad de eliminación de *E. coli*, *Vibrio alginolyticus* y *Salmonella typhimurium*. Las concentraciones de estos microorganismos en las corrientes de alimentación y salida se calcularon mediante el método de recuento de colonias en placas. (Datos numéricos obtenidos detallados en “Anexos I. Resultados numéricos”).

Escherichia coli

Se observó una reducción media de la concentración de un 75'46 % trabajando en un rango de concentraciones cercano a 5500 UFC/mL (Figura 15). El medio empleado para el aislamiento de los microorganismos en la corriente de salida fue el medio EMB. Este medio permite el crecimiento de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae, por lo que existe la posibilidad de que algunas de las colonias contadas para el cálculo de la concentración de la corriente de salida fueran enterobacterias presentes en el agua empleada para la generación de la biocapa que hubieran permanecido en el filtro o en la misma capa biológica, y la capacidad real de eliminación sea algo mayor.

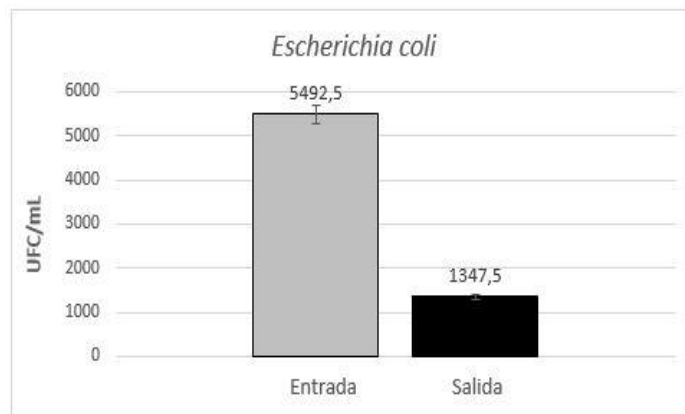


Figura 15. Concentraciones de *E. coli* en UFC/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida del filtro de bio-arena.

Vibrio alginolyticus

Se observó una reducción de la concentración del 100 % trabajando en un rango de concentraciones cercano a 5000 UFC/mL (Figura 16). No creció ninguna colonia en las placas sembradas con la corriente de salida, por lo que se deduce que ningún microorganismo sobrevivió a los procesos sufridos al pasar por el filtro. La cepa empleada (*Vibrio alginolyticus* FRI-58) posee unas características metabólicas y fisiológicas prácticamente iguales en su totalidad a las de la cepa patógena *Vibrio cholerae*, por lo que podría concluirse que se puede lograr una eliminación de hasta el 100% de este patógeno mediante el uso adecuado del filtro de bio-arena en un rango de concentraciones de hasta 5000 UFC/mL.

Dada la altísima dosis infectante necesaria para causar la enfermedad, este sistema sería una garantía suficiente para evitar el contagio de cólera por consumo de agua contaminada de manera moderada.

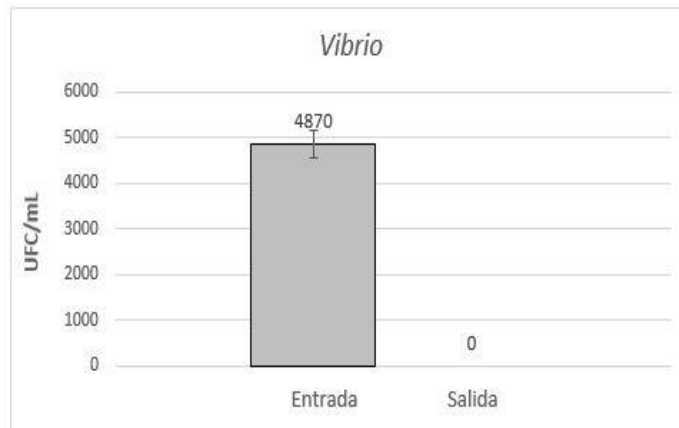


Figura 16. Concentraciones de *Vibrio alginolyticus* en UFC/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida del filtro de bio-arena.

Salmonella typhimurium

Se obtuvo una reducción de la concentración mayor de 98 % (Figura 17). En este caso se trabajó con concentraciones extremadamente altas, mucho mayores que las posibles concentraciones encontradas habitualmente en la naturaleza. Esto se debe a que la cepa de *Salmonella* empleada, transformada para conferirle resistencia a kanamicina, era mucho más impredecible en lo referente a su viabilidad y crecimiento que su análogo *wild type*. Esto generaba que la muerte de algunas de las bacterias derivara en altas desviaciones estadísticas a concentraciones bajas.

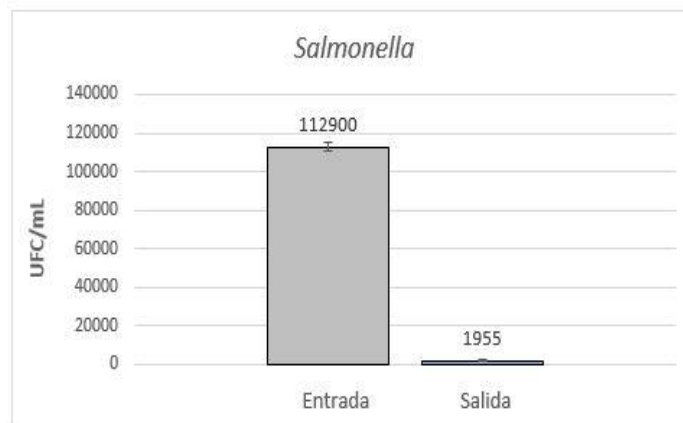


Figura 17. Concentraciones de *Salmonella typhimurium* en UFC/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida del filtro de bio-arena.

Por otra parte, el empleo de altas concentraciones ofreció muy buenos resultados con alta relevancia estadística. El hecho de obtener estos resultados en un rango de concentraciones tan altas garantiza una muy alta reducción de las especies patógenas (de iguales características) en casi cualquier situación mediante el empleo de este sistema. Esto confiere a este filtro una amplia utilidad en casi cualquier área en desarrollo sin disponibilidad de agua potable, ya que existen diversas especies de *Salmonella* patógenas que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo.

Estudios de eliminación de helmintos patógenos

Se analizó la capacidad de eliminación de *S. venezuelensis* y *S. mansoni* empleando una columna empaquetada con arena de filtración. Pese a estar estructurada con los mismos materiales y de manera proporcional, la longitud de la columna de filtración era la mitad que la del filtro. Además, en este caso la filtración se dio únicamente mediante el fenómeno de entrapamiento mecánico, ya que la columna de filtración no dispone de la capa biológica que encontramos en el filtro de bio-arena. Debido a esto, la eficacia de filtración obtenida será como mínimo levemente menor que los posibles resultados ofrecidos por el filtro para la eliminación de los mismos organismos. (Datos numéricos obtenidos detallados en “Anexos I. Resultados numéricos”).

Strongyloides venezuelensis

Se pudo observar una reducción media de la concentración de $>99,95\%$. En este caso se trabajó con concentraciones de 350 larvas/mL (Figura 18). Teniendo en cuenta que este organismo se encuentra en los márgenes de los ríos y otras aguas superficiales, encontrar una concentración tan alta al realizar una recogida de agua en el medio natural sería altamente improbable. Al observar las larvas obtenidas en la corriente de salida mediante la lupa, se determinó que además casi la totalidad de las larvas que salían del filtro estaban muertas. Menos del 15% de las larvas que lograban atravesar la columna de filtración aún se encontraban vivas, por lo que la mayoría de estos organismos que salieron de la columna habrían perdido sus capacidades infectivas y no estarían en condiciones de propagarse a un nuevo hospedador, lo que aumenta aún más la eficacia. Teniendo en cuenta estos resultados, es muy probable que pueda lograrse una eliminación del 100 % de larvas infectivas empleando un filtro de bio-arena completo, teniendo en cuenta que en este aumentaría la eficacia de la filtración mecánica por arena debido a la mayor longitud, así como del proceso global de filtrado gracias al efecto de la biocapa.

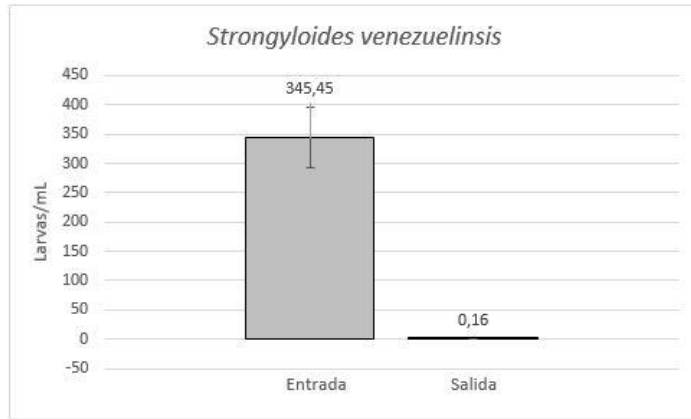


Figura 18. Concentraciones de *S. venezuelensis* en larvas/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida de la columna de filtración.

Schistosoma mansoni

Se observó una reducción en la concentración de cercarias del 100 % (Figura 19). Ninguna de las cercarias introducidas en la columna salió en las corrientes de salida a lo largo de los tres experimentos, separados en el tiempo. Además, se conoce que la duración de las cercarías activas de *Schistosoma mansoni* es de unas 4 horas y tienen una gran fragilidad y facilidad para perder la cola que les confiere la posibilidad de alcanzar el hospedador, por lo que probablemente todas mueren al entrar en la capa de filtración.

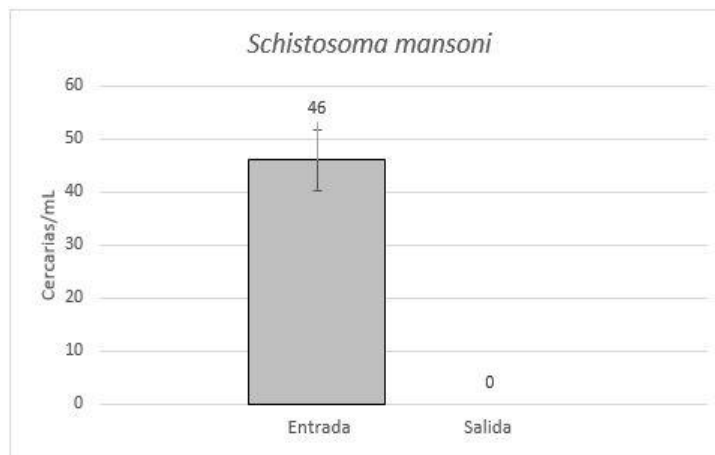


Figura 19. Concentraciones de *S. mansoni* en larvas/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida de la columna de filtración.

Teniendo en cuenta estos resultados, se observa que el empleo del filtro de bio-arena garantiza la eliminación de todos los organismos en estado infectivo de esta especie, considerando además que en este aumentaría la eficacia de la filtración tanto por el aumento de longitud como por el efecto de la biocapa.

Desarrollo de un protocolo para el estudio de eliminación de contaminantes inorgánicos nocivos

Los resultados de los análisis fueron ofrecidos por el Servicio de Análisis de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Salamanca (USAL). Los resultados de los análisis mostraban una gran variabilidad y unos valores estadísticamente poco fiables, por lo que es imposible extraer conclusiones válidas a partir de ellos. Aun así, algunos valores mostraban una posible reducción de la concentración teniendo en cuenta el factor de dilución, lo que abre nuevas puertas a la investigación de este fenómeno. Finalmente, determinamos que aún existen grandes carencias en los protocolos probados. Deberán continuar proponiéndose nuevas opciones y variantes para lograr establecer un protocolo que permita analizar la capacidad que se pretende caracterizar.

DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo, se ha comprobado la capacidad de funcionamiento del modelo presentado de filtro de bio-arena. El proceso de instalación y maduración demostró la capacidad de generación del biofilm en el filtro a través de su uso con aguas superficiales locales, así como de clarificación completa y de eliminación de insectos y nematodos macroscópicos. A través de esta investigación, se ha determinado la capacidad de eliminación de un amplio abanico de contaminantes biológicos. Los experimentos realizados han demostrado que el empleo de este filtro puede asegurar la reducción de la concentración de estos elementos de manera drástica incluso a concentraciones ampliamente mayores que las naturales, ofreciendo la posibilidad de obtener agua apta para su uso por parte de la población, empleando fuentes de agua contaminadas.

En primer lugar, la eficacia demostrada para la filtración de las bacterias patógenas estudiadas, ofrece la posibilidad de obtener agua potable para el consumo en determinados lugares de empleo como viviendas, escuelas o centros de salud. En caso de partir de una fuente de agua altamente contaminada, el sistema permitiría una muy buena regeneración de la misma, haciendo que el empleo de medidas de potabilización paralelas (cloración, yodado, etc...) sean aún más eficaces. Son especialmente notables los experimentos de extracción de *Vibrio*, que han probado la capacidad de eliminar hasta el 100% de las UFC de este organismo. Esto da al sistema una gran utilidad debido a la alta incidencia del cólera en

países en desarrollo en los últimos años, teniendo en cuenta las epidemias dadas el pasado año en Benín, así como la presente epidemia creciente en Oriente Medio, especialmente en Yemen. También es destacable la alta capacidad de eliminación de *Salmonella*, pudiendo reducir la contaminación por este agente en hasta un 98%. En segundo lugar, el alto potencial de eliminación de helmintos parásitos, eliminando hasta el 100% de los patógenos. Esto permite también el tratamiento de aguas destinadas a otros usos humanos, como la higiene personal, procesos de desinfección y limpieza en hogares y hospitales, o ritos religiosos llevados a cabo en iglesias, mezquitas u otros lugares, en los que se aplica agua directamente sobre la piel. Gracias a este procedimiento se podría mejorar extremadamente la calidad de vida de la población, especialmente de los niños (principal grupo de riesgo de estas enfermedades), debido al gran desconocimiento existente sobre la presencia y contagio de esos organismos en la zona. Por último, los resultados obtenidos a partir de los experimentos de filtración de contaminantes químicos muestran que es necesario continuar trabajando en estos protocolos para lograr caracterizar la capacidad de este filtro de extraer contaminantes químicos inorgánicos. Es necesario realizar experimentos más largos y con una mayor cantidad de muestras y controles, para poder determinar los parámetros que nos ofrecerán la posibilidad de determinar esta característica, y así poder comenzar a proponer y probar diversas opciones de mejora.

Como perspectivas de futuro, a partir de este punto los estudios de laboratorio se centrarán en ampliar el rango de estudio de patógenos biológicos, haciendo especial incidencia en posibles brotes de enfermedades que puedan darse en los países a los que esta tecnología puede destinarse. Además, se buscará una mayor significancia estadística mediante la realización de experimentos más amplios, tanto en el tiempo como en el número de muestras. Para su realización se llevarán a cabo estrategias que ofrezcan una alta presión selectiva a la hora de la medición de las concentraciones de las diversas corrientes empleando medios selectivos, diferenciales o plásmidos de resistencia que permitan llevar a cabo una selección mediante el uso de antibióticos. Sobre los experimentos con contaminantes inorgánicos, actualmente se están llevando a cabo pruebas de retención de boro utilizando el biofilm generado en el filtro de bio-arena, en colaboración con el CIDTA, lo que permitirá ampliar los resultados de la posible filtración de diversos químicos contaminantes presentes en áreas en desarrollo. Se espera que estos experimentos, en los que se utiliza el biofilm de manera aislada, ofrezcan un mejor ambiente para determinar la presencia de bacterias capaces de extraer o metabolizar los compuestos analizados. La existencia de un ambiente más controlado y con un menor número de variables, permite caracterizar

mejor todos los parámetros influyentes en el experimento, lo que facilita la adaptación de los protocolos para conformar un experimento eficiente y concluyente.

En cuanto a los estudios de campo, el viaje programado para el verano de 2017 nos permitirá comenzar con los experimentos de filtración con los filtros instalados. Se espera encontrar una correlación entre los resultados obtenidos en el laboratorio con los futuros resultados obtenidos tras la filtración en una situación real. Para ello se tendrá en cuenta las potenciales diferencias a la hora de generar el biofilm con aguas superficiales locales, variaciones en los periodos de uso y tareas de mantenimiento realizadas. Sobre todo en este punto, ha de tenerse en cuenta el total del abanico de posibilidades que se tienen a la hora de la selección de colonias, ya que por ahora no existe la posibilidad de la preparación de suspensiones de microorganismos *in situ*, y el uso de aguas naturales contaminadas introduce una altísima variabilidad en los experimentos. Además, se ha programado un estudio para determinar la presencia y prevalencia de otros parásitos patógenos en humanos en las aguas utilizadas por la población local. Esto ofrecerá nuevas guías para futuros experimentos, a través de las que se pretende lograr una completa caracterización de la capacidad de filtrado del sistema. Estos resultados serán más o menos estimables en función de las similitudes entre los organismos ya estudiados y los próximos a tratar.

Por último, gracias a los resultados obtenidos es posible proponer posibles modificaciones que permitirían mejorar la eficiencia a la hora de obtener agua potable en diversas situaciones. También a lo largo del verano de 2017, a través de OAN International se va a llevar a cabo un proyecto de obtención y utilización de carbón activado en Nikki, lugar de trabajo de la ONG. Si los resultados son positivos, podrá plantearse el generar un nuevo diseño del sistema empleando capas de arena de filtración y este material, para mejorar las posibles propiedades de extracción de químicos. Finalmente y con el mismo objetivo, se propone también la realización de experimentos de inoculación de bacterias que metabolicen o empleen diversos metales pesados y otros químicos nocivos en la capa biológica. La finalidad de esta aproximación sería establecer si existe la posibilidad de crear filtros “especializados” en la extracción de una sustancia determinada, que podrían destinarse a lugares que hayan sufrido derrames o liberaciones al ambiente de algún compuesto contaminante, ya sea por accidente o por catástrofes naturales.

Todos los resultados obtenidos ofrecen una muy buena caracterización de la capacidad y potencial de este sistema, que además cuenta con la gran cantidad de ventajas previamente mencionadas de cara a su construcción, implantación y uso. Además, todo ello ha abierto una serie de frentes de investigación de gran utilidad. Todos ellos serán explorados en el futuro para continuar con el avance de nuestro

conocimiento sobre todos estos procesos que pueden llevarse a cabo para lograr suministrar agua potable suficiente a poblaciones de áreas en desarrollo desfavorecidas y, en última instancia, mejorar la calidad de vida de estas poblaciones injustamente castigadas, a través de la cooperación y la solidaridad.

CONCLUSIONES

Los resultados observados a lo largo de esta investigación estudio respecto a los objetivos planteados inicialmente han sido los siguientes:

- El filtro de bio-arena ofrece una **corriente de salida completamente clarificada y libre de organismos macroscópicos**.
- La contaminación por **bacterias fecales coliformes se reduce** en al menos **un 75%** tras la filtración con el filtro de bio-arena.
- El filtro de bio-arena permite la **eliminación del 100%** de UFC de especies pertenecientes al género *Vibrio*.
- La contaminación por bacterias del género *Salmonella* **se reduce en más de un 98%** mediante la filtración con este sistema.
- La contaminación por *Strongyloides venezuelensis* **se reduce $\geq 99'95\%$** al paso por el filtro de bio-arena.
- El filtro de arena es capaz de **retener el 100% las cercarías infectivas de *Schistosoma mansoni***.
- Se debe continuar trabajando en lograr desarrollar un protocolo para valorar la capacidad de eliminación de contaminantes químicos inorgánicos nocivos, analizando los problemas y errores que se han tenido a lo largo de estos experimentos, para evitar cometerlos en futuras experiencias.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Esrey, S. A., Feachem, R. G., & Hughes, J. M. (1985). Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: improving water supplies and excreta disposal facilities. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(4), 757.
- (2) Palmateer, G. (1999). Toxicant and parasite challenge of Manz intermittent slow sand filter. *Environmental Toxicology*, 14(2), 217-225.
- (3) Elliott, M., Stauber, C. E., DiGiano, F. A., de Aceituno, A. F., & Sobsey, M. D. (2015). Investigation of E. coli and virus reductions using replicate, bench-scale biosand filter columns and two filter media. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 10276-10299.
- (4) Ashbolt, N. J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198(1), 229-238.
- (5) Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., ... & Mathers, C. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*, 379(9832), 2151-2161.
- (6) Stauber, C. E., Elliott, M. A., Koksai, F., Ortiz, G. M., DiGiano, F. A., & Sobsey, M. D. (2006). Characterisation of the biosand filter for E. coli reductions from household drinking water under controlled laboratory and field use conditions. *Water Science and Technology*, 54(3), 1-7.
- (7) Dobosch, D., Gomez Zavaglia, A., & Kuljich, A. (1995). El papel de los alimentos en la transmisión del cólera. *Medicina (B. Aires)*, 55(1), 28-32.
- (8) De Magny, G. C., Guégan, J. F., Petit, M., & Cazelles, B. (2007). Regional-scale climate-variability synchrony of cholera epidemics in West Africa. *BMC Infectious Diseases*, 7(1), 20.
- (9) Cholera anual report, World Health Organisation. *Weekly Epidemiological Record* 23 September 2016, Vol 91, 38 (pp 433-440).
- (10) Gaffga, N. H., Tauxe, R. V., & Mintz, E. D. (2007). Cholera: a new homeland in Africa?. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 705-713.
- (11) Crump, J. A., & Mintz, E. D. (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clinical Infectious Diseases*, 50(2), 241-246.
- (12) Crump, J. A., Luby, S. P., & Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346-353.
- (13) Muyembe-Tamfum, J. J., Veyi, J., Kaswa, M., Lunguya, O., Verhaegen, J., & Boelaert, M. (2009). An outbreak of peritonitis caused by multidrug-resistant *Salmonella typhi* in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Travel medicine and infectious disease*, 7(1), 40-43.
- (14) Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., & Savioli, L. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77(1), 41-51.
- (15) Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., & Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368(9541), 1106-1118.
- (16) Cooke, G. S., Lalvani, A., Gleeson, F. V., & Conlon, C. P. (1999). Acute pulmonary schistosomiasis in travelers returning from Lake Malawi, sub-Saharan Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 29(4), 836-838.

- (17) Crompton, D. W. T. (1999). How much human helminthiasis is there in the world?. *The Journal of Parasitology*, 397-403.
- (18) Van der Werf, M. J., de Vlas, S. J., Brooker, S., Looman, C. W., Nagelkerke, N. J., Habbema, J. D. F., & Engels, D. (2003). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, 86(2), 125-139.
- (19) Lengeler, C., Utzinger, J., & Tanner, M. (2002). Questionnaires for rapid screening of schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(3), 235-242.
- (20) King, C. H., Dickman, K., & Tisch, D. J. (2005). Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *The Lancet*, 365(9470), 1561-1569.
- (21) Ruano, A. L., Martín, T., Pardo, J., López-Aban, J., & Muro, A. (2005). Avances en el estudio sobre la estrongiloidosis. *Enf Emerg*, 7(2), 102-9.
- (22) Kaminsky, R. G., & Lupiac, J. Á. (2011). Estrongiloidiasis, teniasis y otras parasitosis desatendidas en privados de libertad, Honduras. *Rev Med Hondur*, 79(3).
- (23) Jorgensen, T., Montresor, A., & Savioli, L. (1996). Effectively controlling strongyloidiasis. *Parasitology Today*, 12(4), 164.
- (24) Genta, R. M. (1989). Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Review of Infectious Diseases*, 11(5), 755-767.
- (25) Biney, C., Amuzu, A. T., Calamari, D., Kaba, N., Mbome, I. L., Naeve, H., ... & Saad, M. A. H. (1994). Review of heavy metals in the African aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28(2), 134-159.
- (26) AMBIENTAL, I. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*.
- (27) D. Alberto Alonso Díaz, CATICE de Valencia Secretaría de Estado de Comercio (2014). Legislación internacional de residuos de metales pesados.
- (28) Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Brown, A., ... & Coggeshall, M. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1545-1602.



FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



Trabajo de Fin de Grado – Grado en Biotecnología



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

Estudio de un sistema de potabilización mediante filtros de
bio-arena implantado en Benín

ANEXOS

Héctor Castañón Cuadrado



Instituto de Biología
Funcional y Genómica

Tutor:

Francisco del Rey
Instituto de Biología Funcional y Genómica

RESULTADOS Y NUMÉRICOS

Estudios de eliminación de modelos bacterianos

Resultados numéricos de los diversos experimentos de filtración de especies bacterianas realizados. La corriente de alimentación está representada por las muestras a tiempo 0 (T0), mientras que la corriente de salida se caracterizó por la toma de muestras a tiempo 1 (T1) y a tiempo 2 (T2), a la mitad y al final de la segunda carga del filtro con la suspensión de MO.

Escherichia coli

| Muestra | Dilución | Concentración 1 | Concentración 2 | Concentración media |
|----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| T0 | 1 | 494 | 575 | 534,5 |
| | 2 | 286 | 278 | 282 |
| T1 | 1 | 110 | 102 | 106 |
| | 2 | 54 | 64 | 59 |
| T2 | 1 | 148 | 170 | 159 |
| | 2 | 87 | 69 | 78 |

Tabla 1. Concentraciones de *E. coli* en UFC/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida del filtro de bio-arena.

Vibrio alginolyticus

| Muestra | Dilución | Concentración 1 | Concentración 2 | Concentración media |
|----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| T0 | 10 | 54 | 39 | 46,5 |
| | 2 | 286 | 223 | 254,5 |
| T1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 |
| T2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 2. Concentraciones de *Vibrio alginolyticus* en UFC/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida del filtro de bio-arena.

Salmonella typhimurium

| Muestra | Dilución | Concentración 1 | Concentración 2 | Concentración media |
|----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| T0 | 10 | 1046 | 1212 | 1129 |
| T1 | 1 | 47 | 50 | 48,5 |
| | 2 | 14 | 18 | 16 |
| T2 | 1 | 412 | 367 | 389,5 |
| | 2 | 167 | 145 | 156 |

Tabla 3. Concentraciones de *Salmonella typhimurium* en UFC/mL presentes en las corrientes de alimentación y salida del filtro de bio-arena.

Estudios de eliminación de nematodos patógenos

Resultados numéricos de los diversos experimentos de filtración de especies de nematodos parásitos realizados empleando una columna empaquetada con arena de filtración. La corriente de alimentación está representada por las muestras a tiempo 0 (T0). La corriente de salida se recogió y se concentró para medir el número total de larvas que atravesaran la columna.

Strongyloides venezuelensis

| | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Concentracion Entrada (T0) | 218 | 292 | 354 | 320 | 386 | 374 | 286 | 414 | 396 | 352 | 304 | 322 |
| Nº Larvas co- rriente de sa- lida | 4 | 9 | 5 | 10 | 9 | - | - | - | - | - | - | - |
| Total larvas corriente de salida | 37 | | | | | | | | | | | |
| Concentracion salida | 0'105 | | | | | | | | | | | |

Tabla 4. Concentraciones de *Strongyloides venezuelensis* presentes en las corrientes de alimentación y salida.

Schistosoma mansoni

| | | | |
|--|----|----|----|
| Concentracion entrada (T0) | 50 | 42 | 46 |
| Nº Larvas co- rriente de salida | 0 | 0 | 0 |

Tabla 5. Concentraciones de *Strongyloides venezuelensis* presentes en las corrientes de alimentación y salida.

PROTOCOLOS

Nombre del ensayo: Protocolo valoración de eliminación de bacterias mediante filtro de bio-arena.

Fecha: Actualizado en marzo de 2017

Autores: Héctor Castañón y Francisco del Rey.

E-mail: hcc5595@hotmail.com

Descripción general:

Valoración de la eficacia de eliminación de microorganismos (MO) para un modelo de filtro de bio-arena. Protocolo adaptado para el estudio de eliminación de *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus* y *Salmonella typhimurium*.

Materiales:

| Descripción |
|--|
| Cultivo inicial de <i>E. coli</i> |
| Cultivo inicial de <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| Cultivo inicial de <i>Salmonella - typhimurium</i> resistente a kanamicina |
| Medio LB |
| Medio agar nutritivo |
| Medio EMB |
| Medio TCBS |
| Medio agar Mac Conkey+kan |
| Agua destilada |
| Sales suplementarias para la supervivencia del MO en H ₂ O |
| Cubetas de plástico |
| Recipiente de 25 L o mayor |

Equipamiento:

| Descripción |
|------------------------|
| Filtro de bio-arena |
| Microscopio óptico |
| Espectrofotómetro UV-V |

Protocolo de trabajo:

(Protocolo para células criopreservadas)

1. Generación de la solución bacteriana de alimentación:

Titulación de una solución de MO de densidad óptica conocida:

- Preparar medio LB. Calentar el medio en un baño de agua a 30°C.
- Descongelar las bacterias sumergiendo el vial en un baño de agua caliente (30°C) 1-2 minutos. Sacar el vial del baño cuando aún quede un poco de hielo en él.
- Desinfectar el vial con etanol al 70%. Transferir las bacterias a un matraz erlenmeyer con 1/3 de volumen de medio LB previamente calentado.
- Incubar el matraz en una incubadora en agitación a (37°C) durante 24 horas hasta la fase logarítmica.
- Sacar el matraz de la incubadora. Medir la absorbancia de la solución de MO a $\lambda = 600$ nm. Realizar las diluciones necesarias para conseguir una absorbancia dentro del rango lineal del espectrofotómetro. Una buena aproximación tras 24 h de crecimiento es una dilución 1:50.
- Determinar la concentración de MO. Se empleó el método de recuento en placa.
- Preparar diluciones seriadas de 1:10 a 1:10⁷ en el solvente necesario (agua destilada para *E. coli* y *Salmonella*, y cloruro sódico al 0,85% en agua para *Vibrio*).
- Sembrar las diluciones en placas selectivas:
 - *E. coli*: Medio EMB.
 - *Vibrio*: Medio TCBS.
 - *Salmonella*: Medio agar Mac Conkey + kan
- Incubar las placas de cultivo en una incubadora overnight en las condiciones necesarias:
 - *E. coli* y *Salmonella*: 37°C.
 - *Vibrio*: 30°C.
- Tras las 24h de incubación, contar el número de colonias crecidas y determinar la concentración.

Ahora se puede proceder a realizar la solución para el ensayo cuando se desee:

- Preparar medio LB. Calentar el medio en un baño de agua a 30°C.

- Descongelar las bacterias sumergiendo el vial en un baño de agua caliente (30°C) 1-2 minutos. Sacar el vial del baño cuando aún quede un poco de hielo en él.
- Desinfectar el vial con etanol al 70%. Transferir las bacterias a un matraz erlenmeyer con el medio LB previamente calentado.
- Incubar el matraz en una incubadora en agitación a (37°C) durante 24 horas hasta la fase logarítmica.
- Tras la incubación, sacar el matraz de la incubadora. Medir la absorbancia de la solución de MO a $\lambda = 600$ nm empleando diluciones.
- Conociendo la D.O. del cultivo, realizar un cultivo de tamaño suficiente a D.O. = 1.
- Preparar 25 L de solución de concentración deseada empleando la dilución calculada previamente.

2. Proceso de filtración

- Establecer el número de mediciones a realizar. En este caso se realizarán 3 mediciones:
 - T₀: Solución inicial de alimentación.
 - T₁: Primera salida de líquido al filtrar nuestra solución inicial tras desplazar el volumen muerto (empleamos inicialmente 15L para desplazar el volumen muerto).
 - T₂: Solución filtrada cuando falta alrededor de 1L de solución por entrar en el filtro.
- Desplazar el volumen muerto de agua que se encuentra en el interior del filtro con la solución que vamos a estudiar. En este caso el volumen muerto coincide con la capacidad del filtro (12 L), emplear para esto 15 litros de la solución de MO.
- Una vez se ha desplazado el volumen muerto, agregar 10 L de la solución problema al filtro.
- Recoger muestras de la solución resultante a los tiempos previamente determinados.
- Determinar la concentración de MO. Se empleó el método de recuento en placa.
- Realizar diluciones de las muestras recogidas. Una buena estimación es analizar soluciones 1/1, 1/2 y 1/10.
- Sembrar al menos 2 placas de cultivo por cada muestra recogida y dilución en placas selectivas:
 - *E. coli*: Medio EMB.
 - *Vibrio*: Medio TCBS.
 - *Salmonella*: Medio agar Mac Conkey + kan
- Incubar las placas de cultivo en una incubadora “overnight” en las condiciones necesarias:

- *E. coli* y *Salmonella*: 37°C.
- *Vibrio*: 30°C.
- Tras las 24h de incubación, contar el número de colonias crecidas y determinar la concentración.

3. Valoración de la reducción de la concentración de MO mediante la filtración

- Calcular la concentración de MO en las muestras recogidas mediante recuento en placa. Calcular la concentración media.
- Determinar el grado de eliminación conseguido con la filtración.

Composición de los medios

| Medio LB: |
|-----------------------------|
| Bacto tristona 10 g/L. |
| Extracto de levadura 5 g/L. |
| NaCl 10 g/L. |

| Medio EMB: |
|-----------------------------|
| Peptona 10 g/L. |
| Lactosa 5 g/L. |
| Sacarosa 5 g/L. |
| Fosfato dipotásico 2 g/L. |
| Agar 13'5 g/L. |
| Eosina 0'4 g/L. |
| Azul de metileno 0'065 g/L. |

| Medio TCBS: |
|------------------------------|
| Extracto de levadura 5 g/L. |
| Peptona 5 g/L. |
| Triptona 5 g/L. |
| Citrato de sodio 10 g/L. |
| Tiosulfato de sodio 10 g/L. |
| Bilis de buey 8 g/L. |
| Sacarosa 20 g/L. |
| Cloruro de sodio 10 g/L. |
| Citrato férrico 1 g/L. |
| Azul de bromotimol 0'04 g/L. |
| Azul de timol 0'04 g/L. |
| Agar 15 g/L. |

| Medio agar Mac Conkey: |
|-----------------------------------|
| Peptona 17 g/L. |
| Pluripeptona 13 g/L. |
| Lactosa 10 g/L. |
| Mezcla de sales biliares 1'5 g/L. |
| NaCl 5 g/L. |
| Agar 13'5 g/L. |
| Rojo neutro 0'03 g/L. |
| Cristal violeta 0'001 g/L. |

Nombre del ensayo: Protocolo valoración de eliminación de nematodos parasitarios mediante columna de filtración.

Fecha: Actualizado en marzo de 2017

Autores: Héctor Castañón.

E-mail: hcc5595@hotmail.com

Descripción general:

Valoración de la eficacia de eliminación de nematodos parasitarios para una columna de filtración con arena. Los nematodos en sus diferentes fases de su ciclo vital fueron amablemente suministrados por el departamento de parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. Todo el proceso debe realizarse bajo los elementos de seguridad necesarios, en ambiente atemperado a 27°C.

Materiales:

| Descripción |
|--|
| Cultivo inicial de nematodos |
| Copa de sedimentación |
| Embudo de vidrio |
| Placa de vidrio para lupa con pocillos de 0'5 mL |
| Agua mineral |

Equipamiento:

| Descripción |
|---|
| Columna empaquetada con arena de filtración |
| Lupa óptica de aumento |

Protocolo de trabajo:

1. Generación de la solución de alimentación:

- Extraer los nematodos en su forma del ciclo vital deseada y colocarlos en agua mineral atemperada a 27°C. Procesos de obtención detallados en los protocolos de mantenimiento de los ciclos.
- Determinar la concentración de nematodos en la solución inicial.
- Preparar 0'7L de solución del nematodo a la concentración deseada en agua mineral atemperada.

2. Proceso de filtración

- Fijar el caudal de la columna.
- Desplazar el volumen muerto de agua que se encuentra en el interior de la columna con la solución que vamos a estudiar. En este caso el volumen muerto de la columna es 0'35 L.
- Una vez se ha desplazado el volumen muerto, agregar 0'35 L de la solución problema a la columna. Agregar el volumen en tandas de 0'07 L. Recoger una muestra de la solución de alimentación con cada volumen añadido.
- Recoger toda la corriente de salida en copas de sedimentación.
- Dejar sedimentar los nematodos durante 30 minutos.
- Retirar suavemente el agua superficial de las copas de sedimentación empleando una bomba de succión. Dejar un volumen de alrededor de 1 mL.
- Medir la concentración de la corriente de alimentación y realizar el contaje de todos los parásitos presentes en la corriente de salida mediante recuento directo, empleando una lupa de laboratorio.

3. Valoración de la reducción de la concentración de MO mediante la filtración

- Calcular la concentración de MO en las muestras recogidas mediante recuento en placa. Calcular la concentración media.
- Determinar el grado de eliminación conseguido con la filtración.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 1 de 6 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis» | | |

| | |
|---|---|
| Índice | |
| 1 Objetivo..... | 1 |
| 2 Alcance..... | 1 |
| 3 Responsabilidad | 1 |
| 4 Frecuencia | 2 |
| 5 Condiciones de bioseguridad..... | 2 |
| 6 Materiales y equipos..... | 3 |
| 7 Procedimientos | 4 |
| 7.1 Infección de las ratas o jerbos con larvas infectantes de «S. venezuelensis»..... | 4 |
| 7.2 Recogida de heces y preparación de los coprocultivos..... | 4 |
| 7.3 Recuperación de L3 mediante a partir de coprocultivo..... | 5 |
| 7.4 Obtención de larvas o hembras partenogénicas | 5 |
| 7.5 Registro de revisiones..... | 6 |
| 8 Documentos de referencia | 6 |

1 Objetivo


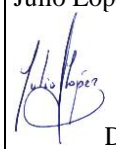
Mantener el ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis».

2 Alcance

Este procedimiento será utilizado con el fin de obtener todas las fases del ciclo biológico de «S. venezuelensis» larvas de distintas fases y hembras partenogénicas adultas para desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, tratamientos, vacunas y estudios de patogenia.

3 Responsabilidad

El responsable del ciclo será un titulado superior con formación básica en parasitología en el Grado (al menos 6 créditos ECTS) y formación especializada de Máster Oficial con contenidos en parasitología (al menos 9 créditos ECTS). También debe tener acreditación nivel C de manejo de animales de experimentación (personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos) de acuerdo con el RD 35/2013. Las tareas del mantenimiento del ciclo serán realizadas por personal técnico de la rama de Ciencias de la Salud entrenados para los procedimientos parasitológicos y

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 2 de 6 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis» | | |

con acreditación de personal de la categoría B para el manejo de los animales. Podrá participar personal en formación (estudiantes de Ciclos Formativos de Formación Profesional, Grado, Master y Doctorado) que realizarán las tareas del ciclo supervisados por el personal técnico y el responsable del ciclo de acuerdo con la legislación vigente.

4 Frecuencia



Este procedimiento deberá ser aplicado cada vez que se necesite renovar el ciclo u obtener fases del ciclo de vida de «S. venezuelensis».

5 Condiciones de bioseguridad

Las tareas del ciclo se desarrollarán en el laboratorio de Hospedadores Intermediarios del Área de Parasitología de la Facultad de Farmacia y en los espacios destinados a animales infectados en el Animalario del Edificio Departamental. Se utilizarán recipientes y superficies impermeables fáciles de lavar y desinfectar.

El personal debe utilizar bata de laboratorio y guantes rutinariamente.

Las mesas y superficie de trabajo se limpiarán al final de cada tarea con agua jabonosa y se secarán con papel toalla. Los objetos cortantes o punzantes utilizados y potencialmente contaminados serán almacenados en recipientes de bioseguridad. Los restos de camas, deyecciones se recogerán en bolsas de plástico para ser eliminados como residuos asimilados a urbanos. A los efluentes líquidos se les agregará 1 ml de lejía por cada 5 l antes de ser eliminados. Los cadáveres de los animales serán almacenados en un congelador a -20 °C y serán eliminados a través del Servicio de Experimentación Animal.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|


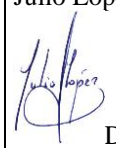
La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 3 de 6 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis» | | |

La limpieza de restos de líquidos y sólidos relacionados con el ciclo biológico se realizará aplicando papel con agua jabonosa sobre el producto para eliminarlo de la superficie afectada. Cuando se maneje la fase infectiva para los roedores se dispondrá de una solución desinfectante que se aplicará sobre los lugares después de ser limpiados.

6 Materiales y equipos

- Cámara de flujo laminar para mantenimiento de animales de experimentación. En sala con temperatura y ciclo de luz/oscuridad controlada.
- Aparato de Baermann (Soporte de barra, nuez, soporte en anillo, manguera de silicona, tubo de ensayo, luz).
- Jaulas para ratas, ratones y gerbos.
- Emparrillado para el fondo de jaula.
- Espátula acodada.
- Varilla.
- Botes de muestras de productos biológicos de 200 ml.
- Vermiculita n° 3.
- Viales tipo Eppendorf.
- Tubos de ensayo.
- Gasas.
- Copas de sedimentación de vidrio o plástico.
- Agujas y jeringas desechables.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 4 de 6 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis» | | |

7 Procedimientos

El ciclo se mantiene de forma rutinaria en el laboratorio en ratas Wistar, ratones o en jerbos «Meriontes unguiculatus» y comprende las siguientes etapas:

7.1 Infección de las ratas o jerbos con larvas infectantes de «S. venezuelensis»



- Tomar 6000-15000 L3 para ratas y 1000-1500 para jerbos en suspensión en solución salina y aplicar mediante inyección subcutánea en un máximo de 0,8 ml.
- Depositar los animales en cama de serrín y esperar al comienzo de la puesta de huevos del parásito.

Bioseguridad: Hay riesgo de pinchazo con aguja al inyectar la dosis.

Bienestar animal: Se debe inmovilizar a los animales para inyectarles la dosis de manera subcutánea.

7.2 Recogida de heces y preparación de los coprocultivos.

- Disponer una capa húmeda (papel empapado con agua destilada) que permitirá que las heces se mantengan húmedas y mantengan vivos los huevos cubierto. Poner un emparrillado de 6 mm de luz que permita el paso de las heces.
- Rotular los botes para la recogida con fecha de infección y la fecha de recogida.
- Cambiar las ratas a otra jaula mientras se realiza la recogida.
- Retirar el emparrillado y recoger las heces con una espátula acodada en botes de 200 ml evitando los restos de pienso.
- Limpiar la jaula, poner una nueva capa húmeda.
- Remover las heces y añadir de agua destilada hasta conseguir un homogeneizado fluido.
- Tomar una pequeña muestra de las heces en viales tipo Eppendorf para contar huevos en heces.
- Añadir vermiculita de calibre grueso poco a poco a los botes y mezclar con una varilla de vidrio para obtener así los coprocultivos.
- Guardar los botes a 28 °C con humedad relativa de más del 80 % y con ventilación suficiente (con la tapa apoyada nada más) durante 3 a 7 días.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA** y **CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 5 de 6 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis» | | |

Bioseguridad: Se pueden derramar las heces, se retiran y se limpia la zona.

Bienestar animal: Manejo cuidadoso al cambiar los animales de jaula. Registrar cualquier alteración que se observe.

7.3 Recuperación de L3 mediante a partir de coprocultivo

- Calentar agua hasta una temperatura de 42-44 °C y depositarla en el aparato de Baermann con un tubo de ensayo de 15 ml.
- Preparar 8 capas de gasa y colocar encima el coprocultivo. Envolverlo e introducirlo en el agua que está en el aparato de Baermann.
- Las L3 estimuladas por la luz y el calor comenzarán a moverse para sedimentar en el fondo del tubo de ensayo.
- Retirar el tubo de ensayo con las L3 a partir de los 35-40 minutos.
- Se retira el sobrenadante con una pipeta y se toma una muestra del fondo para determinar el número de larvas en el microscopio.

Bioseguridad: Se pueden derramar y salpicar líquidos con L3. Se limpia la zona afectada y se aplica solución desinfectante (Alcohol etílico de 70%, clorhexidina).


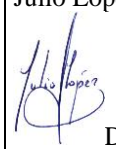
Bienestar Animal: No procede.

7.4 Obtención de larvas o hembras partenogenéticas

- Infectar ratas con 15000-30000 L3 y ratones con 3000-12000 L3.
- Sacrificar las ratas o ratones por sobredosis de anestesia, pentobarbital sódico 100 mg/kg en inyección intraperitoneal o anhídrido carbónico.
- Retirar los pulmones el día 2 post-infección o el intestino delgado el día 7-8 post-infección. Picar los pulmones y el intestino después de retirar el contenido.
- Depositar envueltos en gasas en una copa con solución salina a 37 °C durante 1-2 horas en un baño termostatado.
- Recoger las larvas o hembras del fondo de las copas de sedimentación

Bioseguridad: Se puede derramar líquidos. Se limpia la zona afectada. Riesgo de pinchazo con aguja al aplicar la anestesia.

Bienestar animal: Inmovilizar e inyectar la dosis de infección adecuadamente. Aplicar correctamente el procedimiento para la eutanasia.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 6 de 6 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Strongyloides venezuelensis» | | |

7.5 Registro de revisiones

| Revisión | Fecha aa mm dd | Responsable | Página reemplazada | Aprobado encargado | jefe |
|----------|-------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|------|
| | | | | | |
| | | | | | |



MOTIVO DEL CAMBIO

| |
|--|
| |
|--|

8 Documentos de referencia

Ruano AL, López-Abán J, Fernández-Soto P, de Melo AL, Muro A. Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by «Strongyloides venezuelensis» in mice treated with dexamethasone. Acta Trop. 2015 Dec;152:90-5. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.08.019. PMID: 26342794

Viney ME, Lok JB. The biology of «Strongyloides» spp. WormBook. 2015 Jul 16:1-17. doi: 10.1895/wormbook.1.141.2. PMID: 26183912

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 1 de 7 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION Nº 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

| | |
|--------|--|
| Índice | |
| 1 | Objetivo..... 1 |
| 2 | Alcance..... 1 |
| 3 | Responsabilidad 1 |
| 4 | Frecuencia 2 |
| 5 | Condiciones de bioseguridad..... 2 |
| 6 | Materiales y equipos..... 3 |
| 7 | Procedimientos 4 |
| 7.1 | Infección de ratones con cercarias de «S. mansoni» y mantenimiento 4 |
| 7.2 | Recogida de heces para recuento de huevos. 5 |
| 7.3 | Obtención de adultos del sistema porta..... 5 |
| 7.4 | Mantenimiento de caracoles «Biomphalaria glabrata» 6 |
| 7.5 | Obtención de huevos, eclosión de huevos e infección de caracoles..... 6 |
| 7.6 | Obtención de cercarias de «Biomphalaria glabrata» infectados..... 7 |
| 7.7 | Registro de revisiones 7 |
| 8 | Documentos de referencia 7 |

1 Objetivo


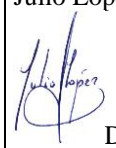
Mantener el ciclo biológico de «Schistosoma mansoni».

2 Alcance

Este procedimiento será utilizado con el fin de obtener todas las fases del ciclo biológico de «S. mansoni» larvas de distintas fases y parejas de adultos para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, tratamientos, vacunas y estudios de patología.

3 Responsabilidad

El responsable del ciclo será un titulado superior con formación básica en parasitología en el Grado (al menos 6 créditos ECTS) y formación especializada de Máster Oficial con contenidos en parasitología (al menos 9 créditos ECTS). También debe tener acreditación para nivel C de manejo de animales de experimentación (personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos) de acuerdo con el RD 35/2013. Las tareas del mantenimiento del ciclo serán realizadas por personal

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 2 de 7 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

técnico de la rama de Ciencias de la Salud entrenados para los procedimientos parasitológicos y con acreditación de personal de la categoría B para el manejo de los animales. Podrá participar personal en formación (estudiantes de Ciclos Formativos de Formación Profesional, Grado, Master y Doctorado) que realizarán las tareas del ciclo supervisados por el personal técnico y el responsable del ciclo de acuerdo con la legislación vigente.

4 Frecuencia

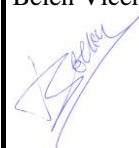
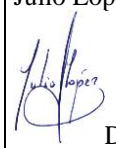
Este procedimiento deberá ser aplicado cada vez que se necesite renovar el ciclo u obtener fases del ciclo de vida de «S. mansoni».

5 Condiciones de bioseguridad

Las tareas del ciclo se desarrollarán en el laboratorio de Hospedadores Intermediarios del Área de Parasitología de la Facultad de Farmacia y en los espacios destinados a animales infectados en el Animalario del Edificio Departamental. Se utilizarán recipientes y superficies impermeables fáciles de lavar y desinfectar.

El personal debe utilizar bata de laboratorio y guantes rutinariamente.

Las mesas y superficie de trabajo se limpiarán al final de cada tarea con agua jabonosa y se secarán con papel toalla. Los objetos cortantes o punzantes utilizados y potencialmente contaminados serán almacenados en recipientes de bioseguridad. Los restos de camas, deyecciones se recogerán en bolsas de plástico para ser eliminados como residuos asimilados a urbanos. A los efluentes líquidos se les agregará 1 ml de lejía por cada 5 l antes de ser eliminados. Los cadáveres de los animales serán almacenados en un congelador a -20°C y serán eliminados a través del Servicio de Experimentación Animal.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|


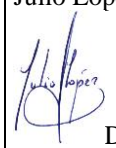
La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 3 de 7 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

La limpieza de restos líquidos y sólidos relacionados con el ciclo biológicos se realizará aplicando papel con agua jabonosa sobre el producto para eliminarlo de la superficie afectada. Cuando se maneje la fase infectiva para los roedores se dispondrá de una solución desinfectante que se aplicará sobre los lugares después de ser limpiados.

6 Materiales y equipos

- Placas de cultivo de 24 y 12 pocillos.
- Colador, pincel y pinzas de plástico.
- Flexo con luz fría, lámpara incandescente.
- Placa de recuentos, vidrio reloj.
- Emparrillado para el fondo de jaula.
- Espátula acodada.
- Botes de muestras de productos biológicos de 200 ml.
- Tubos de ensayo, vasos de precipitados.
- Placas de Petri de plástico y vidrio.
- Copas de sedimentación de vidrio o plástico.
- Agujas y jeringas desechables.
- Placa de metacrilato con recipiente enrejillado.
- Batidora de sobremesa.
- Estereomicroscopio.
- Micropipetas regulables y puntas.
- Agua mineral.
- Vitrina específica para caracoles infectados.
- Trompa de succión.
-

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 4 de 7 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

7 Procedimientos


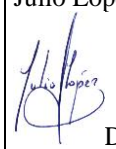
El ciclo se mantiene de forma rutinaria en el laboratorio en ratones CD1 y su hospedador intermediario «Biomphalaria glabrata» y comprende las siguientes actividades:

7.1 Infección de ratones con cercarias de «S. mansoni» y mantenimiento

- Tomar una suspensión acuosa con 50-200 cercarias y aplicar sobre la piel del ratón de dos modos: 1. Poner los ratones en una cubeta con una lámina de agua con cercarias de un espesor de 5-7 mm de modo que se empapen las patas, el abdomen y la cola. El agua deben estar a 25-27 °C. Se debe poner un filtro de jaula a más de 5 cm sobre los animales para evitar que se salgan del recipiente. 2. Sedar los ratones con una mezcla de ketamina 50 mg/kg, diazepam 5 mg/kg y atropina 1 mg/kg en un 100-200 µl mediante inyección intraperitoneal para una sedación de 45 minutos. Poner el ratón en decúbito supino, fijar las patas a la superficie de trabajo y apoyar un anillo de plástico sobre el abdomen con cinta adhesiva. Depositar 0,5-1,5 ml de agua con cercarias sobre el abdomen aprovechando el hueco del anillo.
- Después de 40-45 minutos se les retira la suspensión de agua con cercarias y se les deposita sobre toalla de papel para que se sequen lo antes posible.
- Se les mantiene con la infección por un periodo máximo de 4 meses
- Los animales infectados serán observados diariamente por los cuidadores del animalario, una vez por semana por un miembro del equipo que evaluará: pérdida de condición corporal, secreciones anormales en aberturas naturales, hirsutismo acusado, dificultades de movilidad, disnea, ascitis, baja reactividad, incapacidad para tomar agua o alimentos. Se puntuará 1 muy evidente, 2 Evidente, 3 Poco evidente, 4 Normal. Será sacrificado aquel animal que muestre un índice menor de 3 o aquel en el cual uno de los signos observado sea puntuado con 1. Se utilizará pentobarbital sódico (100 mg/kg) aplicado intraperitonealmente. En los registros de cada lote constarán las incidencias observadas.

Bioseguridad: Hay riesgo de infección de los operadores por salpicaduras con agua con cercarias. Es necesario disponer de solución desinfectante al alcance del operador. Esta tarea debe ser realizada con batas con manga ajustada y guantes.

Bienestar animal: Los animales son inmovilizados con una mezcla anestésica. Debe evitarse que los ratones entren en hipotermia

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 5 de 7 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

7.2 Recogida de heces para recuento de huevos.

- Disponer una capa húmeda (papel empapado con agua destilada) que permitirá que las heces se mantengan húmedas y mantengan vivos los huevos. Poner un emparrillado de 6 mm de luz que permita el paso de las heces.
- Después de 24 horas retirar el emparrillado y recoger las heces con una espátula acodada en botes de 200 ml evitando los restos de pienso.
- Limpiar la jaula, poner una nueva capa húmeda.
- Tomar una muestra de las heces en viales tipo Eppendorf para contar huevos.

Bioseguridad: Se pueden derramar las heces. Se retiran las heces y se limpia la zona.



Bienestar animal: Manejo cuidadoso al cambiar los animales de jaula.

7.3 Obtención de adultos del sistema porta.

- Inyectar a los ratones con una dosis de pentobarbital sódico 100 mg/kg ajustado a 11 el pH con 200 UI/100 ml de heparina en solución salina intraperitonealmente.
- Colocar los ratones en decúbito supino en una placa de metacrilato sobre un emparrillado. Retirar la piel e incidir en el abdomen para exponer la vena porta.
- Abrir la caja torácica e inyectar en el ventrículo izquierdo solución salina con heparina 500 UI/l. Alternativa: trisodio citrato al 0,75% en solución salina.
- Seccionar la vena porta y lavar las venas mesentéricas mediante perfusión. Recoger el líquido en una copa de sedimentación y recoger los vermes.
- Recoger los vermes que se encuentren en las venas mesentéricas.

Bioseguridad: Se puede derramar el líquido usado en la perfusión. Se limpia la zona con agua jabonosa. Riesgo de pinchazo con aguja al aplicar la anestesia.

Bienestar animal: Aplicar adecuadamente la dosis letal de pentobarbital sódico.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|---|----------------|
| | Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | PAGINA 6 de 7 |
| | Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

7.4 Mantenimiento de caracoles «Biomphalaria glabrata»

- Disponer los caracoles en cubetas de plástico transparente a razón de 20-40 caracoles por cubeta.
- Alimentar diariamente con hojas de lechuga.
- Cambiar una o dos veces a la semana el agua mineral en la que viven los caracoles.
- Recoger las puestas adheridas a las paredes del recipiente o flotadores de poliestireno expandido y colocar en un nuevo recipiente para obtener una nueva generación. Agregar un poco de carbonato cálcico en el agua.

Bioseguridad: Se pueden derramar líquidos que serán lavadas con agua jabonosa y secadas.



Bienestar Animal: No procede.

7.5 Obtención de huevos, eclosión de huevos e infección de caracoles

- Recoger uno o dos hígados de ratones infectados entre los 45 y 60 días post-infección.
- Homogeneizar los hígados troceados con una tijera con una batidora en un litro de solución salina 0,9%. Dejar sedimentar durante 20 minutos.
- Retirar el sobrenadante con una bomba de succión. Retirar toda la espuma posible. Dejar únicamente 50-100 ml y suspender de nuevo el sedimento.
- Dejar sedimentar 20 minutos y retirar el sobrenadante con la bomba de succión hasta que queden unos 50 ml.
- Depositar el sedimento en una placa de Petri de vidrio y agregar agua destilada.
- Colocar bajo una bombilla para que alcance 26 °C de temperatura y eclosionen los miracidios.
- Se recogen con una pipeta de 7 a 9 miracidios para cada caracol de 0,5-0,8 mm de diámetro, en placas de 24 pocillos.
- Dejar que se desarrolle la infección hasta el día 26 tras la exposición a los miracidios en la vitrina destinada a caracoles infectados.

Bioseguridad: Los líquidos derramados y las sustancias derivadas de las operaciones se recogerán y la zona afectada se limpiará con agua y jabón.

Bienestar Animal: No procede.

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.

| | | |
|---|--|----------------|
| Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) | | PAGINA 7 de 7 |
| Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca | | REVISION N° 00 |
| PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) | Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular | |
| Mantenimiento del ciclo biológico de «Schistosoma mansoni» | | |

7.6 Obtención de cercarias de «Biomphalaria glabrata» infectados

- A partir del día 26 de la exposición a los miracidios, disponer los caracoles individualmente con agua destilada y exponerlos a luz directa y a 26 °C para estimular la emisión de cercarias. Se utiliza un espacio de seguridad específico.
- Determinar todos los caracoles infectados para hacer lotes homogéneos
- Una vez que las cercarias han sido emitidas contar la concentración de cercarias y preparar dosis adecuadas para infectar los ratones.

Bioseguridad: Se puede derramar líquidos o producirse salpicaduras. Es necesario tener un pulverizador con solución desinfectante para neutralizar la fase infectiva que pasa a través de la piel. Es obligatorio utilizar guantes y bata con manga ajustada para reducir el riesgo. Esta tarea solamente puede ser realizada por personal entrenado específicamente.

Bienestar animal: No procede

7.7 Registro de revisiones



| Revisión | Fecha aa mm dd | Responsable | Página reemplazada | Aprobado encargado | jefe |
|----------|-------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|------|
| | | | | | |
| | | | | | |

MOTIVO DEL CAMBIO

| |
|--|
| |
|--|

8 Documentos de referencia

- Mann VH, Morales ME, Rinaldi G, Brindley PJ. Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2010 Mar;137(3):451-62. doi: 10.1017/S0031182009991211. PMID: 19765348
- Vicente B, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, del Olmo E, Fernández-Soto P, Ramajo-Martín V, Muro A. The combination of the aliphatic diamine AA0029 in ADAD vaccination system with a recombinant fatty acid binding protein could be a good alternative for the animal schistosomiasis control. *Exp Parasitol*. 2015 Jul;154:134-42. doi: 10.1016/j.exppara.2015.04.022. PMID: 25936981
- Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, Muro A, Mollinedo F. Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jul 20;9(7):e0003893. doi: 10.1371/journal.pntd.0003893. PMID: 26191954

| | | |
|---|--|---|
| ELABORADO POR Belén Vicente Santiago, Técnico Especialista.  Licenciada en Biología | REVISADO Y APROBADO POR: Julio López Abán, Veterinario,  Doctor Ciencias Biológicas. | FECHA EMISION: 01-12-2015 Vigencia máxima 01-12-2020 |
|---|--|---|

La información contenida en el presente procedimiento es propiedad de Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS). Es **SECRETA y CONFIDENCIAL**. Las personas que lo reciben son responsables por su seguridad y prevención del uso indebido.