

ARTÍCULO ORIGINAL

Cuantificación y evaluación de la estacionalidad de elementos parasitarios en ambientes acuáticos recreativos de la provincia de Salta, Argentina

Dolores Gutiérrez Cacciabue^{a,b}, María M. Juárez^{a,b,c}, Hugo R. Poma^a, Beatriz Garcé^d y Verónica B. Rajal^{a,b,*}

^a Instituto de Investigaciones para la Industria Química, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de Salta (INIQUI-CONICET, UNSa), Salta, Argentina

^b Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta (UNSa), Salta, Argentina

^c Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta (UNSa), Salta, Argentina

^d SERMed Servicios Médicos, Salta, Argentina

Recibido el 5 de marzo de 2014; aceptado el 22 de mayo de 2014

PALABRAS CLAVE

Calidad de aguas recreativas;
Indicadores bacterianos;
Parásitos;
Salud;
Argentina

Resumen

La contaminación microbiológica de aguas recreativas es un problema preocupante, ya que las personas que las utilizan pueden contraer enfermedades que podrían afectar su bienestar general. Para evaluar la calidad del agua, las legislaciones existentes solo establecen límites de indicadores bacterianos, los cuales no predicen con exactitud la presencia de parásitos. Además, la cantidad de parásitos presentes en el agua, aunque suficiente para producir enfermedad, suele ser pequeña, por lo que, se necesita una etapa previa de concentración para poder detectarlos. En este trabajo se monitorearon trimestralmente durante un año tres ambientes acuáticos de usos recreativos de la provincia de Salta, realizando la concentración de las muestras y la posterior preparación para la búsqueda de elementos parasitarios por microscopía. Adicionalmente, en cada ambiente se midieron mensualmente variables fisicoquímicas *in situ* y variables bacteriológicas por técnicas microbiológicas tradicionales. En cada ambiente se encontraron como mínimo 9 de los 14 parásitos detectados en conjunto. La presencia de los elementos parasitarios no presentó correlación con indicadores bacterianos en ningún ambiente ni en ninguna de las estaciones ($p > 0,05$). Mientras que en invierno la contaminación bacteriológica disminuyó entre un 76 % y un 99 %, los elementos parasitarios no presentaron disminución estacional. Los resultados permiten sugerir al género *Entamoeba* como indicador anual de contaminación parasitaria, ya que este fue encontrado en todos los ambientes con mínimas variaciones estacionales. Estos resultados poseen relevancia epidemiológica, dado que permitirán a los tomadores de decisiones proponer medidas para mejorar el bienestar de la población. © 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vbrajal@gmail.com (V.B. Rajal).

KEYWORDS

Recreational water quality;
Bacterial indicators;
Parasites;
Health;
Argentina

Quantification of parasites in aquatic environments in the Province of Salta, Argentina**Abstract**

Microbiological pollution of recreational waters is a major problem for public health as it may transmit waterborne diseases. To assess water quality, current legislation only requires limits for bacterial indicators; however, these organisms do not accurately predict the presence of parasites. Small number of parasites is usually present in water and although they are capable of causing disease, they may not be high enough to be detected. Detection therefore requires water samples to be concentrated. In this work three recreational aquatic environments located in the province of Salta were monitored over one year. For parasite quantification, water samples were collected every three months and concentrated by ultrafiltration. Detection was performed by microscopy. In addition, monthly monitoring was carried out in each aquatic environment: physicochemical variables were measured *in situ* and bacteriological counts were determined by traditional microbiological techniques. Of 14 parasites identified, at least nine were detected in each aquatic environment sampled. While bacteriological contamination decreased in most cases during winter (76-99%), parasites were present year-round, becoming a continual threat to public health. Thus, we here propose that it is necessary to use specific parasitological indicators to prevent waterborne disease transmission. Our results suggest that *Entamoeba* would be a suitable indicator as it was found in all environments and showed minimal seasonal variation. The results obtained in this study have epidemiological relevance and will allow decision-makers to propose solutions for water protection in order to care for population health.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Las aguas recreativas son aquellas aguas superficiales utilizadas por la población con fines de esparcimiento.

En general, las aguas recreacionales incluyen aguas de piscinas, baños de hidromasajes, aguas termales y aguas naturales superficiales dulces (incluyendo ríos, lagos, lagunas, embalses, etc.) y marinas¹³. Estos ambientes acuáticos de uso recreacional, en especial aquellos que conforman ríos, lagos y diques, son una alternativa para la población que carece de recursos económicos como para acceder a piletas privadas o balnearios, entre otros.

Desde hace ya varios años, se vinculan las actividades recreativas en aguas con problemas en la salud de las personas. En Estados Unidos, el 80 % de las enfermedades adquiridas en ambientes recreativos se deben a infecciones producidas por microorganismos, principalmente parásitos y bacterias⁹. Las infecciones más comunes son intestinales y respiratorias, aunque también pueden resultar afectados los ojos, los oídos y la piel. La principal vía de transmisión es la ingestión de agua contaminada, pero los microorganismos causantes de enfermedad también pueden entrar al cuerpo a través de los oídos, los ojos, la nariz o la piel dañada por un corte o una erupción cutánea⁵⁸. Las fuentes de contaminación de las aguas recreativas pueden ser varias, incluyendo heces humanas y de animales infectados, bañistas, escorrentías pluviales, contaminación de los navegantes, aguas sin tratamiento o insuficientemente tratadas y escorrentía agrícola.

Se han informado al menos 325 brotes de enfermedades de origen hídrico causadas por parásitos en el mundo²⁶. Para

el caso de aguas recreativas, el 43 % de los brotes informados en Estados Unidos durante 2005 y 2006 fueron a causa de parásitos⁹. Entre ellos, *Cryptosporidium* y *Giardia* son conocidos por ser los responsables principales de las enfermedades hídricas de origen recreativo. Ellos persisten en el ambiente por períodos mayores que algunas bacterias, son más resistentes a los tratamientos de desinfección y presentan bajas dosis infectivas⁴⁷. Otro grupo parasitario cuya presencia en el agua es de importancia es el de las amebas de vida libre. A diferencia de otros parásitos patógenos del hombre, ellas tienen la capacidad no solo de sobrevivir en este medio, sino también de reproducirse, y, ocasionalmente, invaden un hospedador y viven como parásitos dentro de sus tejidos⁵⁵.

Por otro lado, en los países en desarrollo, las enfermedades causadas por parásitos son habituales, y las escasas inversiones en saneamiento ambiental, como así también las condiciones climáticas en algunos de ellos, favorecen su proliferación. En Argentina, los enteroparásitos más frecuentes en niños menores de 14 años son *Enterobius vermicularis* y *Giardia lamblia*⁶. En una reciente revisión de los géneros parasitarios presentes en el ambiente de nuestro país se encontró amplia coincidencia con los informados en muestras fecales de pacientes, de lo que se concluye que los parásitos que pueden causar patologías intestinales en humanos se aíslan frecuentemente de muestras ambientales²⁵.

A pesar de que algunos estudios plantean que las bacterias no son buenas indicadoras de la presencia de patógenos en el agua^{23,39}, las legislaciones vigentes las siguen utilizando durante el monitoreo rutinario para evaluar la contami-

nación de los recursos hídricos^{14,52,54}. Debido a la falta de estudios epidemiológicos, Argentina carece de legislaciones propias referidas a límites de calidad para aguas de uso recreativo, por lo que se han tomado como valores guías niveles de indicadores bacterianos de acuerdo con estándares internacionales⁵². En este sentido, la Unión Europea establece como valor límite para bacterias coliformes totales 10 000 en 100 ml y para el caso de coliformes fecales el valor debe ser menor de 2000 en 100 ml¹⁴. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) establece un límite de 61 unidades formadoras de colonias (UFC)/100 ml para el caso de enterococos y 235 UFC/100 ml para *Escherichia coli*⁵⁴.

Se ha demostrado que algunos virus y parásitos pueden ser utilizados como potenciales indicadores de contaminación en aguas^{39,41}. Con respecto a los parásitos, diferentes trabajos han evaluado la calidad parasitológica de muestras de agua y han detectado una gran cantidad de especies presentes^{2,5,19,22,39,56}. Las cantidades de estos organismos presentes en el agua, si bien son suficientes para producir enfermedad, son generalmente pequeñas para permitir su detección, por lo que es necesario realizar previamente una etapa de concentración^{20,39,40,41}. Uno de los procesos empleados con este fin es la ultrafiltración (UF). Mediante el empleo de una membrana de tamaño de poros determinado, se logra retener a los microorganismos, que luego son recuperados, para su posterior detección por técnicas específicas^{1,40,42}.

Los objetivos de este trabajo fueron detectar la presencia de elementos parasitarios en distintos ambientes acuáticos de la provincia de Salta con intenso uso recreativo; evaluar la estacionalidad de los hallazgos y compararla con la que muestran las bacterias indicadoras; y encontrar un parásito o grupo de parásitos que puedan servir como potenciales indicadores de contaminación parasitaria en aguas.

A pesar de que existen estudios en el país en donde se han detectado diferentes elementos parasitarios en el medio ambiente (agua y suelo) y, principalmente, en materia fecal^{12,51}, hasta donde llega nuestro conocimiento, este constituye el primer estudio de estas características en Argentina. Es por ello que los resultados obtenidos en este trabajo poseen relevancia epidemiológica, ya que a partir de ellos se podrá en un futuro proponer medidas de protección para las personas y para el recurso acuático.

Materiales y métodos

Muestreo

Se monitorearon en este estudio tres ambientes acuáticos ubicados en la provincia de Salta: dique Campo Alegre, río Vaqueros y río La Caldera. De cada uno de ellos se recolectaron 20 l de agua trimestralmente durante el año 2010. De ese modo, se obtuvieron muestras de las cuatro estaciones: verano (de enero a marzo) y primavera (de octubre a diciembre), en ambos casos en correspondencia con la época de lluvia o estación húmeda, y otoño (de abril a junio) e invierno (de julio a septiembre), dentro de la época o estación seca. Cada muestra para el análisis para-

sitológico se colectó en un balde limpio y previamente enjuagado con el agua objeto de estudio, se enjuagó también el bidón en el que se almacenaría la muestra y finalmente se lo llenó.

Por otro lado, para contar con una referencia sobre la calidad de las aguas, mensualmente se realizó el análisis fisicoquímico (*in situ*) y bacteriológico de los mismos ambientes. Para los análisis bacteriológicos se colectaron muestras adicionales siguiendo el *Standard Method for Examination of Water and Wastewater for Surface Waters*¹³. En este caso, la recolección se realizó en frascos de vidrio estériles de 500 ml, los que se almacenaron a 4 °C hasta su llegada al laboratorio y análisis. Las muestras se procesaron dentro de las cuatro horas posteriores a su llegada.

Caracterización fisicoquímica

Se determinaron *in situ* las siguientes variables fisicoquímicas: pH, conductividad (COND), turbidez (TURB), oxígeno disuelto (OD) y temperatura (T), utilizando el analizador multiparamétrico U10 de HORIBA (Tokyo, Japón).

Recuento bacteriano

Se estimó la densidad de bacterias coliformes totales (CT) y fecales (CF) empleando el método de tubos múltiples en caldo MacConkey (Britania, Argentina), con incubación a 37 °C ± 0,5 °C y 44 °C ± 0,5 °C, respectivamente, durante 24 h¹³. La densidad bacteriana de la muestra se estimó en términos de número más probable en 100 ml (NMP/100 ml). Aplicando la técnica de filtración por membrana se determinaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ECL), en agar mTEC modificado (Fluka, EE.UU.) a 44,5 °C durante 24 h¹⁵, y enterococos (EN), en agar mE (Difco, EE.UU.) a 41 °C durante 48 h y confirmación en agar esculina-hierro (EIA) a 41 °C por 20 min¹⁶. Los resultados se expresaron en UFC/100 ml.

Concentración de aguas por UF para la detección de elementos parasitarios

La concentración de las muestras se realizó por medio de un sistema de ultrafiltración (UF) en fibra hueca empleando el módulo AHP 1013 de Microza (Pall, EE.UU.), con peso molecular de corte de 50 000 daltons⁴¹. Los 20 l de agua fueron vertidos en el tanque de alimentación del sistema e impulsados por medio de una bomba peristáltica a través del módulo de UF, con lo que se obtuvieron dos corrientes, la de permeado libre de microorganismos y la de retenido, que se recirculó al tanque de alimentación⁴¹. El proceso continuó hasta que se alcanzó el menor volumen posible de retenido (40 a 60 ml). Posteriormente se incorporó en dos etapas 15 ml de una solución de elución, que contenía 0,05 mol/l de glicina/NaOH pH 7,0 y 0,1 % de Tween 80⁴⁰, y ésta se hizo recircular por el sistema (sin permeado) durante 15 minutos, con el objetivo de liberar aquellas partículas adsorbidas a la membrana. Los eluidos se juntaron con el retenido para conformar el concentrado final, que se usó para la detección de elementos parasitarios.

Acondicionamiento de la muestra concentrada para la búsqueda de elementos parasitarios

Antes de la determinación parasitológica se acondicionó la muestra de agua concentrada de acuerdo a lo explicado en el ítem anterior. En primer lugar, se eliminaron partículas microscópicas o restos que pudieran confundirse con los elementos parasitarios buscados. Para ello, se filtraron 20 ml de las muestras a través de tres capas de gasa; se dividió cada muestra en dos y a cada una de ellas se la concentró nuevamente aplicando dos métodos: el de flotación de sacarosa de Sheather⁵⁰ y el de sedimentación por centrifugación de Charles Barthelemy, modificado por Bacigalupo y Rivero³². El sedimento se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y posteriormente se resuspendió en solución de sacarosa al 10 %. Para evitar pérdida de la morfología característica de los elementos parasitarios, en este punto las muestras se conservaron de tres maneras diferentes: en formol al 10 %, en acetato de sodio-ácido acético-formalina (SAF)⁵⁹ y en mertiolate-yodo-formaldehído (MIF)⁴⁴.

Recuento de elementos parasitarios

La identificación de trofozoítos, quistes, ooquistes, huevos y larvas se realizó por microscopía directa (100X, 400X o 1000X) de las muestras preservadas. Se usaron preparaciones húmedas con solución de lugol para identificar trofozoítos o quistes de protozoos y huevos o larvas de helmintos. Se utilizaron coloraciones húmedas con eosina o azul de

metileno para identificar ooquistes y con safranina modificada para esporas de *Microsporidium*. Se realizó también coloración tricrómica permanente de las muestras originales concentradas o de las conservadas en formol y SAF para detectar esporos de protozoos y microsporidios⁵⁶. El recuento de huevos de helmintos se realizó por el método de cuantificación de Stoll⁵³.

Resultados y discusión

Importancia de los elementos parasitarios encontrados en los ambientes acuáticos

En cada uno de los ambientes acuáticos analizados se encontraron como mínimo 9 de los 14 parásitos identificados (tabla 1, fig. 1). Hay que tener en cuenta que, al igual que otros agentes patógenos, los parásitos que se transmiten con mayor frecuencia a través del agua son los que presentan infectividad alta, los que pueden proliferar en ella o los que demuestran elevada resistencia fuera del organismo⁸. Esta última premisa la cumplen las formas latentes de los parásitos (quistes, ooquistes, huevos), y si bien no pueden multiplicarse en el ambiente, sí pueden hacerlo algunas formas de vida libre, tales como algunas amebas⁴⁵ y *Strongyloides stercoralis*²⁹.

La gran mayoría de los elementos reconocidos pertenecen al grupo de los protozoos, los que generalmente se encuentran asociados a enfermedades transmitidas por el

Tabla 1 Elementos parasitarios encontrados (por litro de agua) en los distintos ambientes acuáticos y en las diferentes estaciones a partir de concentrados obtenidos mediante la ultrafiltración de 20 litros de agua

Elementos parasitarios/l agua	Río La Caldera				Río Vaqueros			Dique Campo Alegre			
	OT	IN	PR	VE	OT	IN	VE	OT	IN	PR	VE
Amebas (T)	5	8	-	10	-	8	13	-	8	5	-
<i>Ascaris lumbricoides</i> (H)	-	-	-	8	-	-	10	-	-	5	-
<i>Balantidium coli</i> (Q)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
<i>Blastocystis hominis</i> (P y M)	8	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-
<i>Blastocystis hominis</i> (Q)	-	-	8	-	-	-	-	-	13	-	-
<i>Cryptosporidium</i> sp. (O)	-	-	-	-	5	-	-	5	-	-	-
<i>Cyclospora</i> sp. (O)	-	-	5	-	5	10	-	-	-	-	-
<i>Dientamoeba fragilis</i> (T)	-	-	-	-	-	-	8	-	13	-	-
<i>Endolimax nana</i> (Q)	-	8	8	-	-	-	10	-	10	-	-
<i>Entamoeba</i> spp. (T)	-	-	-	8	-	-	-	5	-	-	-
<i>Entamoeba</i> spp. (Q)	8	8	8	8	8	8	8	15	15	8	8
<i>Enterobius vermicularis</i> (H)	-	-	-	9	-	-	8	10	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i> (Q)	8	8	5	6	8	-	-	25	10	-	10
<i>Isoospora</i> sp. (O)	-	-	-	-	-	13	-	-	10	-	-
<i>Microsporidium</i> sp. (E)	8	20	35	5	5	8	13	5	35	15	15
<i>Trichomonas</i> sp. (T)	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-

OT: otoño; IN: invierno; PR: primavera; VE: verano. Se indican entre paréntesis las distintas formas: trofozoito (T), huevo (H), quiste (Q), ooquiste (O) y espora (E), prequiste y multivacuolar (P y M).

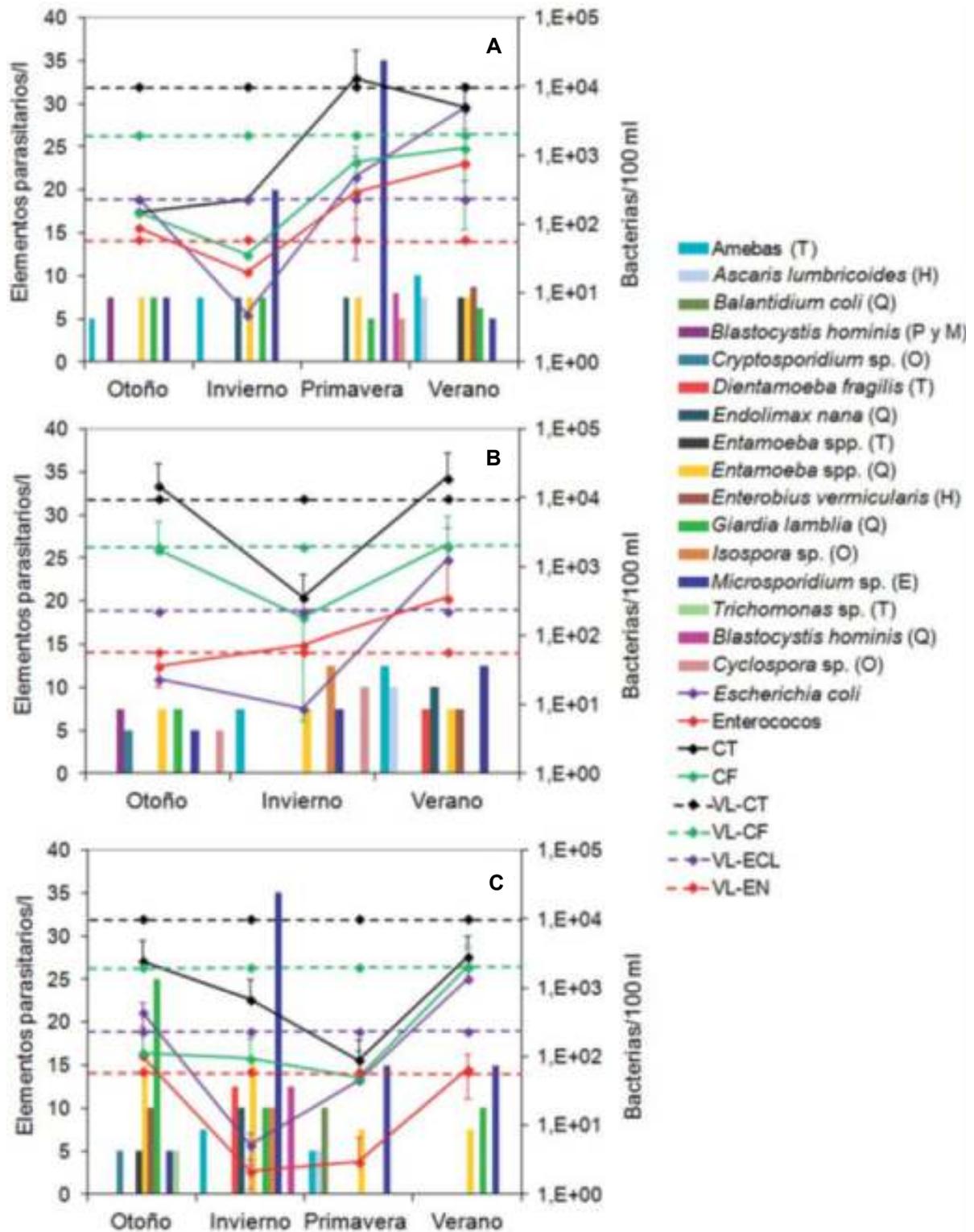


Figura 1 Cuantificación de elementos parasitarios (barras verticales) e indicadores bacterianos (líneas continuas) en los ambientes acuáticos (A) río La Caldera, (B) río Vaqueros y (C) dique Campo Alegre, localizados en la provincia de Salta, Argentina. Estos últimos se presentan como valores promedios, con sus desviaciones estándares, de los tres meses incluidos en cada estación del año. Las líneas punteadas representan los valores límites (VL) de los indicadores bacterianos (medidos en el eje secundario) establecidos por diferentes normativas para aguas con usos recreativos: coliformes totales (CT) 10 000 NMP/100 ml, fecales (CF) 1000 NMP/100 ml, *Escherichia coli* (ECL) 235 UFC/100 ml y Enterococos (EN) 61 UFC/100 ml. No se obtuvieron medidas para el río Vaqueros durante la primavera debido a la ausencia de agua durante esta estación.

agua; es por esto que se los puede hallar con mayor frecuencia en estas muestras³. En los tres ambientes acuáticos monitoreados se encontraron amebas en general, sin especificar género. Si bien no todas las amebas encontradas en el ambiente (por ej. en agua o suelo) son causantes de enfermedad, algunas de ellas tienen la capacidad de alojar bacterias, como *Legionella* spp. y otras, que pueden ocasionar patologías en poblaciones de inmunodeprimidos³⁰.

Con respecto al grupo *Entamoeba*, es importante aclarar que aunque no todas son patógenas para el hombre, la mayoría proviene del intestino humano, por lo que su presencia en agua indica una posible contaminación fecal⁶. Además, la eventual ingesta de este protozoo puede ir acompañada por otros parásitos que sí son patógenos. Hay que considerar también que la línea demarcatoria entre comensalismo y parasitismo no es rígida, muchas veces los parásitos viven como comensales en un hospedador y solo en determinadas ocasiones producen daño⁵⁷. El elemento infectivo para contraer amebiasis por *E. histolytica* es el quiste, por esta razón se han enumerado de modo separado de los trofozoítos de *Entamoeba* (tabla 1). La amebiasis intestinal causada por *E. histolytica* es la tercera enfermedad parasitaria más extendida y responsable de muertes en el mundo, después de la malaria y la esquistosomiasis²⁶.

Endolimax nana, ameba cosmopolita de patogenicidad dudosa, es comensal del intestino humano y del de algunos animales, y se transmite por la ruta fecal-oral. Presenta alta prevalencia, principalmente en zonas tropicales y subtropicales⁴⁸. Las condiciones de vida precaria y el consumo de agua y alimentos contaminados son algunos de los factores responsables de la presencia de este parásito en la población⁴⁸. En este estudio se detectó *E. nana* en todos los ambientes acuáticos analizados; su presencia ya ha sido informada por otros autores en todo el mundo: en agua con distintos usos³⁹, en aguas residuales de una planta de tratamiento²⁷, en alimentos crudos y cocidos³⁷, en materia fecal de niños y en el suelo⁵¹, y en materia fecal y orina¹⁸.

Muchos trabajos asociaron la presencia de *E. nana* con *Blastocystis hominis*^{18,48}. Aunque ambos parásitos son considerados no patógenos, Graczyk *et al.*¹⁸ demostraron que pueden estar asociados con diarrea en niños.

En cuanto a los coccidios, en dos de los tres ambientes se han encontrado *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., y en los tres *Isospora* spp. (reclasificado por el CDC como *Cystoisospora* spp.)³³ (fig. 1). El ooquiste maduro de *Cryptosporidium* es la forma infectante del parásito; este tiene características importantes que incrementan su potencial patogenicidad: es resistente a condiciones adversas (sobrevive a los niveles de cloración usados en la potabilización del agua: 0,2 a 0,5 mg/l de cloro residual), la dosis infectiva es muy baja (de 1 a 10 ooquistes)⁷ y son infecciosos inmediatamente después de su excreción por el hospedador previo⁴⁷. Los otros dos géneros requieren maduración externa de sus ooquistes para actuar como elementos infectivos.

Se observaron quistes de *G. lamblia* en todos los ambientes (fig. 1). Este género cosmopolita es ya muy conocido por ser el causante de brotes transmitidos por el agua, al igual que *Cryptosporidium* spp.²⁶. Estos parásitos son muy comunes en aguas residuales, por lo que su presencia puede estar relacionada con algún tipo de descarga ilegal de efluentes domésticos o industriales³⁹. La presencia ubicua de patóge-

nos y los tratamientos ineficientes de efluentes llevan a una proliferación de estos organismos en aguas superficiales, con una alta probabilidad de causar efectos adversos no solamente en humanos, sino también en animales².

Se encontraron *Trichomonas* sp. solamente en el dique Campo Alegre (fig. 1C). A pesar de ser elementos frágiles por encontrarse solo en forma de trofozoito, Pereira-Neves y Benchimol³⁶ demostraron que cepas de *T. vaginalis* pueden mantenerse viables hasta 30 h en aguas de una de pileta de natación.

Microsporidium es un género artificial que abarca especies insuficientemente descritas o clasificadas y en el que se agrupan varias especies patógenas humanas. Puede considerarse un patógeno emergente transmitido por el agua⁴⁹, ya que siete especies de microsporidios han demostrado ser agentes etiológicos de enfermedad en los seres humanos, especialmente en individuos inmunocomprometidos o inmunosuprimidos^{19,26}.

En el dique Campo Alegre se encontró *Balantidium coli* (fig. 1C). El agua es el principal vehículo de este ciliado que infecta a humanos y a cerdos, y que causa diarrea y disentería⁴⁶. Este organismo es el más grande entre los protozoos y su trofozoito puede alcanzar hasta 150 µm de longitud.

Se han encontrado diversas formas de *Blastocystis* spp. en todos los ambientes (fig. 1). Este es un organismo oportunista²¹, con mayor prevalencia en los países en desarrollo, relacionado con la falta de higiene, la exposición a los animales y el consumo de alimentos o agua contaminados²⁸.

Dientamoeba fragilis, protozoo también de distribución mundial y habitante del tracto gastrointestinal humano, fue encontrado en el dique Campo Alegre y en el río La Caldera (figs. 1A y 1C). Ubicado definitivamente dentro de los flagelados²⁴, en la actualidad existe evidencia que apoya su patogenicidad^{4,21}. Solamente se encuentra en forma de trofozoito, por lo que se postula que podría ser transportado por los huevos de algunos nematodos parásitos comunes, como *E. vermicularis*^{35,43}.

Entre los metazoarios solo se hallaron dos especies. Una de estas fue *E. vermicularis*, encontrada en ambos ríos (figs. 1A y 1B). Este es, probablemente, el más común de los helmintos que infectan a los seres humanos, se han registrado tasas de prevalencia de hasta el 100 % en el noroeste de Europa y los EE.UU.³⁴. No es un género zoonótico, por lo que su presencia indica contaminación antrópica. El otro metazoario encontrado en todos los ambientes estudiados fue el geohelminto *A. lumbricoides*. Sus huevos requieren maduración en tierra para volverse infectivos.

Aunque no fue el objeto de este estudio, en la observación microscópica se detectó también en todos los ambientes acuáticos la presencia de ácaros y levaduras.

Estacionalidad de los hallazgos

En todos los ambientes acuáticos se observaron algunas diferencias en los valores de las variables fisicoquímicas medidas en cada estación (tabla 2). Para el caso de la temperatura, el agua del río Vaqueros fue la que presentó el mínimo valor durante el invierno (11 °C) y la del dique Campo Alegre, el máximo durante el verano (25 °C) (tabla 2). En el caso del pH, no hubo una gran variación, los valores oscilaron entre 7 y 8. En algunos casos, los cambios de los valo-

Tabla 2 Variables fisicoquímicas medidas en los ambientes acuáticos

	Primavera			Verano		
	DiqCA	Rvaq ^a	RCald	DiqCA	RVaq	RCald
T (°C)	21,7 ± 4,9	-	22,2 ± 0,5	25,0 ± 3,1	20,5 ± 2,2	23,9 ± 1,9
pH	9,7 ± 0,2	-	8,4 ± 0,1	8,4 ± 0,6	7,5 ± 0,5	8,4 ± 0,2
OD (mg/l)	8,0 ± 0,1	-	9,0 ± 0,0	6,0 ± 1,6	8,1 ± 0,9	7,8 ± 1,7
COND (µs/cm)	115,7 ± 8,0	-	194,3 ± 33,2	105,2 ± 10,2	71,5 ± 5,9	189,7 ± 13,7
TURB (UNT)	24,8 ± 9,7	-	17,3 ± 16,1	12,4 ± 3,6	61,0 ± 185,0	410,7 ± 319,7
	Otoño			Invierno		
	DiqCA	RVaq	RCald	DiqCA	RVaq	RCald
T (°C)	18,4 ± 0,3	14,9 ± 2,7	17,4 ± 0,0	14,3 ± 0,9	11,7 ± 0,2	13,7 ± 0,0
pH	7,7 ± 0,2	7,9 ± 0,2	8,3 ± 0,0	8,3 ± 0,9	7,9 ± 0,2	8,65 ± 0,0
OD (mg/l)	4,4 ± 0,8	8,2 ± 0,3	7,6 ± 0,0	7,0 ± 2,2	9,5 ± 0,3	9,14 ± 0,0
COND (µs/cm)	114,5 ± 2,9	92,0 ± 4,4	257,0 ± 0,0	115,3 ± 2,4	90,5 ± 0,7	230,0 ± 0,0
TURB (UNT)	3,0 ± 2,3	6,3 ± 9,2	1,0 ± 0,0	7,7 ± 5,0	15,0 ± 1,4	2,0 ± 0,0

RVaq: río Vaqueros; DiqCA: dique Campo Alegre; RCald: río La Caldera. T: Temperatura; OD: oxígeno disuelto; COND: conductividad; TURB: turbidez.

Los valores que se presentan corresponden al promedio y desviación estándar de los tres meses incluidos en cada estación del año.

^a No se realizaron mediciones en el río Vaqueros durante la primavera debido a la ausencia de agua durante dicha estación.

res de las variables fisicoquímicas entre estaciones pueden influir en la presencia o ausencia de ciertos microorganismos.

En el río La Caldera, las especies que estuvieron presentes durante todas las estaciones fueron *Entamoeba* spp., *Microsporidium* sp. y *G. lamblia* (fig. 1). Los quistes de *G. lamblia* y los huevos de *A. lumbricoides* fueron los elementos parasitarios más informados en investigaciones realizadas en el ambiente en la República Argentina²⁵.

La ausencia de agua en el río Vaqueros durante la primavera hizo que no fuera posible tener datos para esa época. Al igual que en el río La Caldera, durante el verano se detectaron *E. vermicularis* y *A. lumbricoides*, por lo que estos parásitos parecerían estar altamente relacionados con la época húmeda (fig. 1). Como fue dicho anteriormente, el primer género es parásito exclusivo de humanos, por lo que su presencia en la época estival se debe al comienzo de las actividades recreativas humanas, favorecidas por la temperatura. En el caso del geohelminto *A. lumbricoides*, las bajas temperaturas no son favorables para su desarrollo⁵¹. A su vez, los dos ríos analizados presentan cercanía geográfica y usos similares¹⁷ por lo que es de esperar que se encuentren especies similares de parásitos (figs. 1A y 1B).

Durante la estación húmeda, el aumento del caudal debido a las precipitaciones abundantes y el uso recreativo aumentan la turbidez del agua, efecto observado en los ríos estudiados (tabla 2). La turbidez se refiere a la claridad del agua y no tiene efectos directos sobre la salud, pero puede indicar la presencia de microorganismos causantes de enfermedades hídricas (www.epa.gov). Si las partículas resuspendidas tienen organismos adheridos, estos también se resus-

pondrán y eventualmente se podrán desorber, lo que implica un potencial riesgo de infección¹⁰. Por otro lado, la turbulencia contribuye a la oxigenación del agua, aunque los valores variables de OD obtenidos en los distintos ambientes pueden explicarse por el hecho de que los contaminantes del agua (fertilizantes, desechos industriales, material particulado) son hidrolizados por los microorganismos presentes, que van consumiendo el oxígeno y generando condiciones anaerobias. El OD es crucial para la supervivencia de organismos acuáticos, de hecho, valores menores que 2 mg/l podrían matar a los peces¹¹. Sin embargo, los elementos de resistencia de los parásitos no requieren oxígeno, debido a que no se encuentran metabólicamente activos.

Los coccidios *Isoospora* sp. y *Cryptosporidium* sp. estuvieron presentes solamente en la época seca en el río Vaqueros.

En cuanto al género *Blastocystis*, Ithoi *et al.*²² investigaron la presencia de este protozoo en aguas recreacionales, y comunicaron correlaciones positivas con coliformes. En nuestro caso se observó que solamente en el río La Caldera la aparición de la forma quística de *Blastocystis* se relacionó con el aumento de coliformes totales y fecales en primavera (fig. 1A).

En el dique Campo Alegre, la estacionalidad de los elementos parasitarios merece un tratamiento especial, debido a que la turbidez, que se incrementa generalmente en los ríos por el aumento de las precipitaciones y los usos recreativos, no aumentó en este ambiente (tabla 2), por lo que no sería este el factor responsable del aumento en el número de géneros observables en el agua. Es posible que el momento en el que se encuentra mayor variedad de gé-

neros sea la época seca debido a la disminución del volumen de agua, lo que produce una concentración de distintos contaminantes (en este caso, de elementos parasitarios) en esta estación, cuando baja el nivel del dique³⁸. Solo en este último ambiente se encontraron *Balantidium coli* en primavera e invierno (fig. 1C) y el género *Trichomonas* en otoño. Es esperable no encontrar frecuentemente estos últimos elementos debido a su mayor fragilidad, ya que solo están en el estadio de trofozoíto. La razón por la cual la membrana celular de estos elementos frágiles no se vería alterada³¹ podría radicar en que, a diferencia de los ríos, la conductividad en este ambiente no presentó diferencias entre estaciones, de hecho se mantuvo constante a lo largo del año. Podemos considerar que la fuerza iónica en el agua no varía demasiado, ya que la principal fuente que contribuye a esta variable es la gran cantidad de sales disueltas provenientes de una mala gestión de riego, de minerales de la escorrentía de aguas pluviales o de otras descargas¹¹.

El género *Dientamoeba* fue hallado en aguas del dique en invierno y el helminto *A. lumbricoides* fue encontrado en primavera.

Con respecto a la calidad bacteriológica del agua, se observó que en todos los ambientes acuáticos estudiados y, en la mayoría de los casos, en invierno, la contaminación disminuyó considerablemente (fig. 1): 90-96 % en el caso de enterococos, 99 % para *E. coli* (bacteria muy sensible al frío), 76-98 % para coliformes totales y 91-97 % para coliformes fecales. Esto sucedió a pesar del efecto de concentración por la disminución del caudal o volumen de agua. Contrariamente, en el verano la contaminación microbiana fue elevada, a pesar del efecto de dilución causado por las precipitaciones abundantes. Solo en primavera en el río La Caldera se observó una mayor concentración de CT y en el río Vaqueros la disminución de CT y CF fue mucho menor (23 % y 14 %, respectivamente). Sin embargo, esta disminución no se observó ni en cantidad ni en variedad en el caso de los elementos parasitarios, en todas las estaciones estuvieron presentes como mínimo tres géneros (fig. 1). Es por ello que las citadas bacterias no serían útiles para indicar la presencia de especies parasitarias en el ambiente acuático³⁹.

Frecuencia de aparición de elementos parasitarios y su importancia como potenciales indicadores de calidad

Con el objeto de encontrar un elemento parasitario que pudiera servir como futuro indicador de calidad, se realizó un análisis de la frecuencia estacional de aparición teniendo en cuenta todos los datos colectados (fig. 2). Para este análisis, los datos se agruparon en dos: los correspondientes a la estación húmeda (EH), incluyendo verano y primavera, y los correspondientes a la estación seca (ES), con los datos colectados en otoño e invierno.

Nueve de los catorce parásitos encontrados presentaron una mayor frecuencia de aparición durante la ES, mientras que *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* y *B. coli* se detectaron con mayor frecuencia durante la EH (fig. 2), por lo que estos tres podrían postularse como candidatos a organismos indicadores durante dicha estación. La primera y la última de las especies nombradas se encontraron solamente en la EH, que es cuando se incrementan las actividades recreativas. Sin

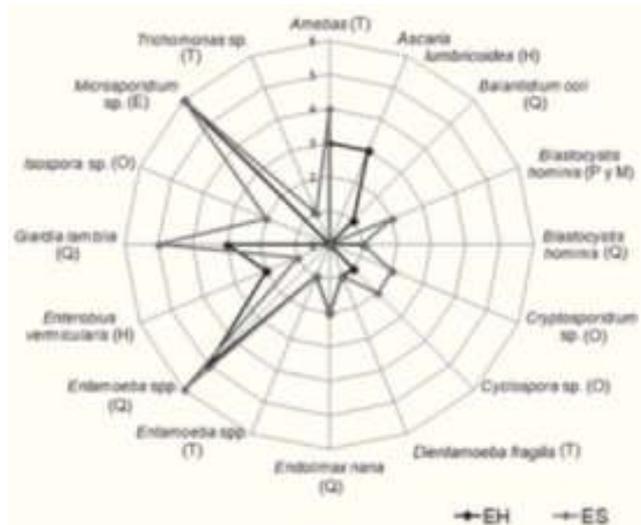


Figura 2 Frecuencia de aparición de elementos parasitarios (cantidad de veces que aparece un elemento en una determinada estación) considerando los datos obtenidos en todos los ambientes acuáticos y durante la estación húmeda (EH) y seca (ES).

embargo, no todos ellos fueron detectados en todos los ambientes acuáticos (fig. 1). Son cuatro los géneros que presentaron una frecuencia de aparición constante en ambas estaciones: los quistes de *Blastocystis*, los trofozoítos de *D. fragilis*, *Microsporidium* sp. y los quistes de *E. nana* (fig. 2).

Microsporidium es uno de los parásitos que estuvo presente en todas las muestras analizadas en los tres ambientes acuáticos (figs. 1 y 2). Poma et al.³⁹ han sugerido a este parásito como un posible candidato a indicador parasitológico. Sin embargo, los quistes de *Entamoeba* spp. también estuvieron presentes en todos los ambientes acuáticos y en todas las estaciones (figs. 1 y 2). Al ser los quistes elementos con mucha mayor resistencia al medio externo, y considerando que su tamaño es casi diez veces mayor que el de las esporas del primer género mencionado (lo que los convierte en elementos más fáciles de identificar), se puede considerar que los quistes de *Entamoeba* spp. son aún mejores candidatos a indicadores parasitológicos.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las variaciones estacionales en los ambientes acuáticos ejercen un fuerte efecto en la dinámica poblacional de elementos parasitarios y bacterias indicadoras, y que estos estarían principalmente influenciados por los cambios de temperatura, las precipitaciones y la cantidad de personas que concurren a estos ambientes para realizar actividades recreativas.

En general, la frecuencia de aparición de algunos de los elementos parasitarios encontrados en los ambientes acuáticos se mantuvo constante a lo largo del año, sin importar la estación. Se requiere un estudio más profundo para conocer cuáles son los factores que influyen en la estabilidad y capacidad infectiva de los estadios presentes en el agua. Esa presencia constante es preocupante, ya que puede ser causa de brotes relacionados con actividades recreativas, tal como se ha informado en muchos lugares del mundo. Sin embargo, la presencia de los elementos parasitarios no presentó correlación con los indicadores bacterianos en ninguna de las estaciones ($p > 0,05$), por lo que se sugiere propo-

ner indicadores específicos para estos casos. Un posible candidato podría ser *Microsporidium* sp., ya que se lo detectó en todas las muestras analizadas, aunque se prefirió proponer al género *Entamoeba* debido a que también se lo encontró en todas las muestras, con mínimas variaciones estacionales, y su mayor tamaño permite identificarlo más fácilmente por personas menos entrenadas, además, sin la necesidad de colorear la muestra. También se identificaron especies características de cada estación, como el caso de *A. lumbricoides*, que por el mayor tamaño de sus huevos sería de utilidad en monitoreos durante la estación húmeda. En cualquier caso, el monitoreo sistemático de los cuerpos acuáticos parecería ser lo más adecuado para alertar a los usuarios sobre los peligros involucrados y, eventualmente, brindar información valiosa para su mitigación. A su vez, estos resultados son útiles para una posterior evaluación cuantitativa del riesgo para la salud de las personas expuestas a los distintos patógenos en aguas superficiales. Esto permitirá a los tomadores de decisiones proponer, por un lado, nuevos indicadores de contaminación del recurso, y por otro, adoptar medidas tendientes a controlar dicha contaminación.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

El presente trabajo tuvo financiación parcial del Fogarty International Center (National Institutes of Health), Universidad de California, Davis, Estados Unidos, a través del UCD-INIQUI Agreement N.º 06001055-02 y del Proyecto N.º 2070/4 financiado por el Consejo de investigación de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSA). La Dra. Dolores Gutiérrez Cacciabue, la Dra. María Mercedes Juárez y el Dr. Hugo R. Poma cuentan con becas posdoctorales del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2009;158:104-9.
- Ayed BL, Schijven J, Alouini Z, Jemli M, Sabbahi S. Presence of parasitic protozoa and helminth in sewage and efficiency of sewage treatment in Tunisia. *Parasitol Res*. 2009;105:393-406.
- Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res*. 2011;45:6603-14.
- Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes*. 2011;2:3-12.
- Betancourt WQ, Querales LJ. Parásitos protozoarios entéricos en ambientes acuáticos. Métodos de concentración y detección. *Interciencia*. 2008;33:418-23.
- Birri ML, Bezombe M, Manuale M. Relación entre parasitosis intestinales y grado de educación sanitaria de la población. *Aula Universitaria*. 2004;6:67-87 [Online]. Disponible en: http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/publicaciones/bitstream/1/1733/1/AU_2004_6_pag_67_87.pdf. Consultado el 5-12-2013.
- Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:579-84.
- Castro-Hermida JA, Garcia-Preedo I, Almeida A, Gonzalez-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci Total Environ*. 2008;405:45-53.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events - United States, 2005-2006 and surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking. United States, 2005-2006. *MMWR CDC* 2008; 57SS-9:1-70 [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss5709.pdf>. Consultado el 5-2-2014.
- Chandran A, Varghese S, Kandeler E, Thomas A, Hatha M, Mazumde A. An assessment of potential public health risk associated with the extended survival of indicator and pathogenic bacteria in freshwater lake sediments. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214:258-64.
- Chapman D. Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring. 2nd ed. Cambridge, University Press, WHO; 1996.
- Costamagna SR, Visciarelli E, Lucchi LD, Basualdo JA. Parásitos en aguas del arroyo Naposta, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Parasitol Latinoam*. 2005;60:122-6.
- Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington DC, APHA; 2005.
- EC, Council-Directive. Concerning the quality required of surface water intended for the abstraction of drinking water in the Member States. 1975.- [Online]. Disponible en: www.nomosphysis.org.gr/attachments/39/75-440.pdf. Consultado el 13-11-2013.
- EPA, Environmental Protection Agency. Method 1603: *Escherichia coli* (E. coli) in water by membrane filtration using modified membrane-thermotolerant *Escherichia coli* agar (Modified mTEC). EPA-821-R-09-007 Washington DC, EPA, 2002[Online]. Disponible en: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/method_1603.pdf
- EPA, Environmental Protection Agency. Method 1106.1: enterococci in water by membrane filtration using membrane-Enterococcus-esculin iron agar (mE-EIA). EPA-821-R-02-021, Washington DC. 2002 [Online]. Disponible en: <http://www>

- epa.gov/microbes/documents/1106_1sp02.pdf. Consultado el 1-10-2013.
17. Gutiérrez Cacciabue, D. Resistencia y persistencia de organismos patógenos en ambientes acuáticos de la Provincia de Salta-Sistemas para la mitigación y el control de la contaminación. Tesis Doctoral. 2013. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta. Argentina.
 18. Graczyk TK, Shiff CK, Tamang L, Munsaka F, Beitin AM, Moss WJ. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitol Res.* 2005;98:38-43.
 19. Graczyk TK, Sunderland D, Tamang L, Shields TM, Lucy FE, Breyse PN. Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4095-9.
 20. Hill VR, Kahler AM, Jothikumar N, Johnson TB, Hahn D, Cromeans TL. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4218-25.
 21. Hotez P. The other intestinal protozoa: enteric infections caused by *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, and *Dientamoeba fragilis*. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2000;11:178-81.
 22. Ithoi I, Jali A, Mak JW, Wan Sulaiman YW, Mahmud R. Occurrence of *Blastocystis* in water of two rivers from recreational areas in Malaysia. *J Parasitol Res.* 2011. doi:10.1155/2011/123916 [Online]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135064/pdf/JPR2011-123916.pdf>. Consultado el 10-2-2014.
 23. Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol.* 2006;40:7132-40.
 24. Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:553-70.
 25. Juárez MM, Rajal VB. Parasitosis intestinales en Argentina: principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45:196-204.
 26. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007;5:1-38.
 27. Khanum H, Shanjida Khanam S, Sultana M, Uddin MH, Chandra Dhar R, Islam MS. Protozoan parasites in a wastewater treatment plant of Bangladesh Univ. *J Zool Rajshahi Univ.* 2012;31:5-8.
 28. Kozubsky LE, Archelli S. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis* sp., un parásito controversial. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2010;44:371-6.
 29. Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli AF, Levecke B, Socias E, Arias LM, Sosa N, Abraham D, Cimino R, Echazu A, Crudo F, Vercruyse J, Albonico M. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS Neglect Trop Dis.* 2013;7:1-7.
 30. Lau HY, Ashbolt NJ. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol.* 2009;107:368-78.
 31. Lloyd D, Harris JC, Biagini GA, Hughes MR, Marouli S, Bernard C, Wadley RB, Edwards MR. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress. *Microbiology.* 2004;150:1183-90.
 32. Magaró HM. Tópicos de parasitología. Parásitos del tracto intestinal humano: Aspectos epidemiológicos, morfológicos, biológicos, clínicos, diagnóstico y profilaxis, de protozoos y helmintos. 1.ª ed. Saarbrücken, Editorial Académica Española; 2011. México.
 33. Magill AJ, Ryan ET, Maguire JH, Strickland GT, Solomon T, Hill DR. Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases. Londres, Nueva York, Oxford, St. Louis, Sidney, Toronto, Saunders, 2012.
 34. Mahmoud AAF. Intestinal nematodes. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases. 5.ª ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2000. p. 2938-43.
 35. Menghi CI, Makiya R, Gatta CL, Méndez OC. *Dientamoeba fragilis*: técnicas moleculares para dilucidar su modo de transmisión. *Parasitol Latinoam.* 2005;60:25-31.
 36. Pereira-Neves A, Benchimol M. *Trichomonas vaginalis*: in vitro survival in swimming pool water samples. *Exp Parasitol.* 2008;118:438-41.
 37. Perez-Cordón G, Rosales MJ, Valdez RA, Vargas-Vásquez F, Cordova O. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Salud Pública* 2008;25:144-8.
 38. Pesce SF, Wunderlin DA. Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba City (Argentina) on Suquia River. *Water Res.* 2000;34:2915-26.
 39. Poma HR, Gutiérrez Cacciabue D, Garcé B, Gonzo EE, Rajal VB. Towards a rational strategy for monitoring microbiological quality of ambient waters. *Sci Total Environ.* 2012;433:98-109.
 40. Poma HR, Rajal VB, Blanco Fernández MD, Barril PA, Giordano MO, Masachessi G, Martínez LC, Isa MB, Freire MC, Riviello López G, Cisterna G, Nates SV, Mbayed VA. Evaluation of concentration efficiency of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PP7 in various water matrices by different methods. *Environ Monit Assess.* 2013;185:2565-76.
 41. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Wuertz S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California storm water. *Water Res.* 2007;41:4287-98.
 42. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res.* 2007;41:1411-22.
 43. Roser D, Nejsum P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Exp Parasitol.* 2013;133:57-61.
 44. Sapero JJ, Lawless DK. The MIF strain preservation technique for the identification of intestinal protozoa. *Am J Trop Med Hyg.* 1953;2:613-9.
 45. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004;34:1001-27.
 46. Schuster FL, Ramirez-Avila L. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:626-38.
 47. Schwab KJ. Are existing bacterial indicators adequate for determining recreational water illness in waters impacted by nonpoint pollution? *Epidemiology.* 2007;18:21-2.
 48. Shah M, Tan CB, Rajan D, Ahmed S, Subramani K, Rizvon K, Mustacchia P. *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* co-infection resulting in chronic diarrhea in an immunocompetent male. *Case Rep Gastroenterol.* 2012;6:358-64.
 49. Sharma S, Sachdeva P, Virdi JS. Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;61:424-8.
 50. Sheather AT. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J Comp Pathol.* 1923;36:266-75.
 51. Soriano SV, Barbieri LM, Pierangeli NB, Giayetto AL, Manacorda AM, Castronovo E, Pezzani BC, Minvielle M, Basualdo JA. Intestinal parasites and the environment: frequency of intestinal parasites in children of Neuquen, Patagonia, Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.* 2001;43:96-101.
 52. SRHN, Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Desarrollos de niveles guías nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a *Escherichia coli*/Enterococos. República Argentina. 2003 [Online]. Disponible en: <http://www.pnuma.org/agua-miaac/CODIA%20CALIDAD%20DE%20>

- LAS%20AGUAS/MATERIAL%20ADICIONAL/PONENCIAS/PONENTES/Tema%205%20Niveles%20Guías%20Calidad%20de%20Aguas/NIVELES%20GUIA/4%20-%20Desarrollos/escherichia.pdf. Consultado el 15-12-2013.
53. Stoll NR, Hausheer WC. Concerning two options in dilution egg counting: small drop and displacement. *Am J Hyg.* 1926;6:134-45.
 54. USEPA, United States Environmental Protection Agency. Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria (May 2002 draft). Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC (EPA-823-B-02-003 [Online]. Disponible en: <http://www.epa.gov/waterscience/standards/bacteria> . Consultado el 1-10-2013.
 55. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50:1-26.
 56. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med.* 1992;326:161-6.
 57. Winner HI. The transition from commensalism to parasitism. *Br J Dermatol.* 1969;81(Supl 1):62-8.
 58. WHO, World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 2. Swimming pools and similar environments. 1.^a ed. Ginebra, Suiza, WHO Press; 2006 [Online]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546808_eng.pdf. Consultado el 10-11-2013.
 59. Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *Am J Clin Pathol.* 1977;67:300-4.