



**ADAPTRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para  
a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia

# Procedimiento de trabajo

Determinación y cuantificación de  
huevos de helmintos en aguas  
residuales y depuradas

Objectivo 2 - Actividade 2.2

**Autor:** Néstor Abreu

**Revisado por:** Gilberto Martel y Vanessa Millán

**Parceiro:** ITC

**Fecha:** octubre de 2020

**Versión:** 1





# INDICE

|   |   |
|---|---|
| 1. OBJETO .....   | 2 |
| 2. ALCANCE .....  | 2 |
| 3. REFERENCIAS .....  | 2 |
| 4. DEFINICIONES .....   | 2 |
| 5. FUNDAMENTO .....   | 3 |
| 5.1. Método de concentración para la detección de huevos de Helmitos: método de Bailenger modificado. ... | 3 |
| 5.2. Confirmación. ....   | 3 |
| 6. REACTIVOS Y SOLUCIONES .....   | 3 |
| 6.1. Reactivos.....   | 3 |
| 6.2. Soluciones:.....   | 3 |
| 7. EQUIPAMIENTO .....   | 4 |
| 8. MATERIAL FUNGIBLE .....  | 5 |
| 9. PROCEDIMIENTO .....  | 5 |
| 9.1. Etapa de concentración .....   | 5 |
| 9.2. Etapa de desorción .....   | 6 |
| 9.3. Etapa de flotación.....  | 7 |
| 9.4. Etapa de recuento .....  | 7 |
| 10. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS .....   | 7 |
| 11. OBSERVACIONES.....  | 8 |
| 11.1. Tamaño de la muestra.....   | 8 |
| 11.2. Tiempos de sedimentación .....  | 8 |
| 11.3. Búffer acetoacético .....   | 8 |
| 11.4. Cámara de McMaster .....  | 9 |
| 11.5. Uso de centrifugas .....  | 9 |



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



## 1. OBJETO

El objetivo de este procedimiento es establecer un plan de trabajo para la determinación de Huevos de Helmintos (HH) (nematodos, cestodos y trematodos) en aguas residuales cuando el ensayo se realiza según el siguiente método.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento se establece para la determinación de HH en aguas residuales. Este es un método útil, simple y económico, que sin embargo tiene ciertas limitaciones, aunque de todos los métodos disponibles, con este se recuperan de manera fiable los huevos de la mayoría de especies de helmintos más importantes desde el punto de vista de la salud humana, además de ser un método reproducible y ampliamente utilizado en los laboratorios de todo el mundo.

## 3. REFERENCIAS

- Ayres RM, Mara D. 1996. Analysis of Wastewater Use in Agriculture - A Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques. WHO, Geneva, ISSN 92 4 154484 8.

## 4. DEFINICIONES

**Helmintos:** Son animales eucariotas pluricelulares y denominados comúnmente gusanos. El término no tiene carácter taxonómico y se usa sobre todo en parasitología, para referirse a especies animales de cuerpo largo o blando que infestan el organismo de otras especies. Los principales grupos de helmintos son los trematodos y cestodos (gusanos planos) y nematodos (gusanos redondos). Los dos primeros pertenecen al filum de los platelmintos, mientras que el segundo forma un filum propio sin ninguna relación con los anteriores.

**Cámara de McMaster:** Cámara de recuento para huevos de helmintos que consta de dos compartimentos independientes, abiertos lateralmente y cubiertos por un cubreobjetos fijo. Cada compartimento tiene una altura de 0,15 cm y en la parte inferior del cubreobjetos hay trazado un cuadrado de 1 cm de lado, dividido en columnas para facilitar el recuento. De esta manera, la capacidad de cada una de las áreas rayadas es de 0,15 cm<sup>3</sup> (0,3 ml. es la capacidad de las dos áreas rayadas de la cámara).

## 5. FUNDAMENTO

### 5.1. Método de concentración para la detección de huevos de Helmintos: método de Bailenger modificado.

Es un proceso químico mediante el cual, después de la sedimentación de una muestra de agua residual/depurada, el sedimento final es tratado con reactivos químicos para separar los huevos de helmintos de la materia orgánica presente en la muestra. En una fase final, los huevos terminan de separarse mediante flotación en una solución con una densidad determinada.

### 5.2. Confirmación.

Varias alícuotas de la muestra concentrada y mezclada con la solución de flotación, se observan bajo microscopio óptico para detectar los huevos de helmintos presentes.

## 6. REACTIVOS Y SOLUCIONES

### 6.1. Reactivos

1. Sulfato de zinc monohidratado ( $ZnSO_4 \cdot H_2O$ ) (CAS nº 7446-19-7) (Scharlab Ref. 38980-0010, o similar).
2. Acetato de etilo ( $CH_3-COO-CH_2-CH_3$ ) (CAS nº 141-78-6) (Scharlab Ref. AC01411000 o similar).
3. Acetato sódico trihidratado ( $CH_3COONa$ ) (CAS nº 6131-90-4) (Scharlab Ref. SO00300250 o similar).
4. Ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ ) (CAS nº 64-19-7) (Scharlab Ref. AC03421000 o similar).
5. Tween 80 (Polisorbato 80) ( $C_{64}H_{124}O_{26}$ ) (CAS nº 9005-65-6) (Scharlab Ref. TW00801000 o similar).
6. Agua destilada tipo II.

### 6.2. Soluciones:

1. Solución de sulfato de zinc (densidad relativa 1,18) (g/100 ml)



| Reactivo                      | Cantidad |
|-------------------------------|----------|
| Sulfato de zinc monohidratado | 33 g     |
| Agua destilada                | 100 ml   |

2. Buffer acetoacético (pH 4,5).

| Reactivo                    | Cantidad              |
|-----------------------------|-----------------------|
| Acetato sódico trihidratado | 15 g                  |
| Ácido acético glacial       | 3,6 mL                |
| Agua destilada              | enrasar hasta 1 litro |

3. Solución de Tween 80.

| Reactivo       | Cantidad |
|----------------|----------|
| Tween 80       | 1 ml     |
| Agua destilada | 1000 ml  |

## 7. EQUIPAMIENTO

1. Agitador vórtex, con regulación de velocidad, para homogeneizar la muestra.
2. Centrífuga de sobremesa capaz de alcanzar 1000g, con adaptadores para frascos de 250 ml., tubos de centrífuga de 50 y 15 ml.
3. Balanza de precisión (0,001 g).
4. Refrigerador.
5. Autoclave, capaz de mantener una temperatura de  $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
6. Microscopio óptico con oculares 4X, 10 X, 20X, 40X.
7. Cámara de McMaster, para el recuento de las formas parásitas.
8. Pipeta automática de 1000  $\mu\text{l}$ .



**ADAPTARES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



9. Pipeta automática de 5000  $\mu$ l.
10. Frascos lavadores para solución de Tween 80.
11. Gradillas para tubos de fondo cónicos de 50 y 15 ml (tipo Falcon).
12. Tubería de silicona transparente 6x10 mm, 5 m.
13. Recipientes de plástico de 12 litros para la sedimentación de las muestras.

## 8. MATERIAL FUNGIBLE

1. Pipetas Pasteur.
2. Frascos para centrífuga de 250 ml.
3. Puntas para pipeta automática 100-1000ul.
4. Puntas para pipeta automática 1000-5000  $\mu$ l.
5. Tubos tipo falcon de 50 ml.
6. Tubos tipo falcon de 15 ml.
7. Guantes desechables de varias tallas (S, M,L, XL).

## 9. PROCEDIMIENTO

El método es muy eficiente para su utilización con aguas residuales/depuradas. Sin embargo, el tamaño de la muestra se debe incrementar hasta los 10 litros en el caso de los efluentes de aguas depuradas para aumentar la eficiencia en la recuperación de los huevos, ya que en este tipo de aguas el número de huevos suele ser muy bajo.

### 9.1. Etapa de concentración

1. Se depositan 10 litros de agua residual tratada o regenerada en un contenedor de plástico de 12 litros de capacidad o 1 litro de agua residual bruta en un contenedor de 2 litros, ambos de paredes verticales. Anotar el volumen (V).
2. Dejar sedimentar la muestra 1-2 horas (preferiblemente toda la noche) sobre una superficie horizontal y no mover el recipiente durante la sedimentación.
3. Eliminar el 90% del sobrenadante usando un sifón con una manguera de silicona (se puede utilizar también una bomba de vacío).



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



- Transferir cuidadosamente el sedimento a uno o más frascos de centrífuga de 250 ml, dependiendo del volumen. Lavar el recipiente con la solución detergente (Tween 80) y transferir este lavado a los frascos de centrifuga.
- Centrifugar a 1000g durante 15 min (se puede utilizar una velocidad superior).
- Eliminar el sobrenadante por aspiración suave ya que el sedimento se resuspende con facilidad (se puede utilizar aspiración con una bomba de vacío). En el caso de que se haya utilizado más de un frasco en el paso anterior, transferir el sedimento a un solo frasco (recordar lavar cuidadosamente los tubos con la solución detergente para evitar pérdidas de sedimento) y centrifugar a 1000 g durante 15 min (se puede utilizar una velocidad superior). Realizar esta operación hasta que el sedimento quede concentrado en un solo frasco.
- Una vez se encuentre todo el sedimento en un solo frasco, resuspender en una pequeña cantidad de solución detergente y con la ayuda de una pipeta de 5 ml traspasar a un tubo tipo Falcon de 15 o de 50 ml en función del volumen del sedimento.
- Se centrifuga de nuevo a 1000 g durante 15 min, se elimina el sobrenadante y se anota el volumen final del sedimento.

## 9.2. Etapa de desorción

- Resuspender el sedimento en un volumen igual del buffer acetoacético (si el volumen del sedimento es de 2 ml, añadir 2 ml del buffer). Si el sedimento es menor a 2 ml, añadir buffer hasta 4 ml para asegurar que, durante la posterior extracción con acetato de etilo, exista suficiente volumen de buffer sobre el sedimento para evitar la resuspensión de éste.
- Añadir dos volúmenes de acetato de etilo y mezclar la solución minuciosamente mediante vórtex. La muestra también puede mezclarse mediante una agitación manual vigorosa.
- Centrifugar la muestra a 1000g durante 15 min (en este paso la velocidad de centrifugación no puede ser superior). La muestra queda separada en tres fases distintas. Todos los restos hidrosolubles y residuos pesados, incluyendo los huevos de helmintos e incluso larvas y protozoos, quedan incluidos en la capa inferior. Sobre esta capa, quedará una fase clara que se corresponde con el buffer. Los residuos liposolubles y otros materiales quedan incluidos en la capa de acetato de etilo, que pueden llegar a formar un tapón oscuro y grueso.
- Anotar el volumen del residuo conteniendo los huevos. Se elimina el sobrenadante (las dos capas superiores) vertiendo el contenido de forma suave. En algunos casos será necesario romper el tapón de residuos liposolubles mediante una pipeta Pasteur para verter el sobrenadante y evitar que se pueda resuspender el sedimento. Este sobrenadante se elimina en un contenedor que contenga una solución de lejía u otro desinfectante.



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



### 9.3. Etapa de flotación

1. Resuspender el sedimento en 5 volúmenes de la solución de sulfato de zinc (si el volumen de sedimento es de 1 ml, añadir 5 ml de la solución de sulfato de zinc). Anotar el volumen final del producto (X ml). Mezclar la muestra cuidadosamente mediante vórtex, o manualmente de forma vigorosa. Tener en cuenta que se requiere un volumen mínimo de 1,5 ml para llenar las dos cámaras de un portaobjetos de McMaster.
2. Centrifugar a 250 g 20 seg, lo que consigue que los residuos más pesados vayan al fondo y los huevos de helmintos floten cerca de la superficie de la solución de sulfato de zinc.

### 9.4. Etapa de recuento

1. Recoger cuidadosamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur, o pipeta automática de 1000 µl, la parte superior del sobrenadante (unos 2 ml), donde se encuentran concentrados los huevos, y transferir a una cámara de McMaster. Llenar todas las cámaras del portaobjetos.
2. Antes de proceder al estudio microscópico de la preparación, dejar la cámara portaobjetos en reposo durante unos minutos en la platina del microscopio, para que las estructuras parasitarias floten en la superficie del líquido contenido en la cámara.
3. Realizar la observación al microscopio con objetivos de 20x y 40x revisando toda la capa superficial del tubo de centrifuga. También se puede realizar la lectura de 2 o 3 cámaras y hacer la media del número de huevos contabilizados. Contar todos los huevos dentro de la retícula de las cámaras. Entre recuento y recuento lavar la cámara con agua en abundancia.

## 10. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Calcular el número de huevos por litro según la fórmula:

$$N=A \cdot X / P \cdot V$$

N= Número de huevos por litro de muestra.

A= Número de huevos contabilizados en la cámara o la media del número contabilizados en 2 o 3 celdillas.

X= Volumen del producto final (ml).

P= Volumen de la celdilla de la cámara de McMaster (0,3 ml).

V= Volumen de la muestra original (litros).





**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



Debido al bajo número de huevos que se observan normalmente, puede no usarse esta fórmula, si no que se contabilizan los huevos observados en la totalidad del volumen del sobrenadante recogidos por flotación, observándose todo el espacio de la cámara de McMaster y no exclusivamente el interior de la retícula.

## 11.OBSERVACIONES

### 11.1. Tamaño de la muestra

Se asume que los huevos se encuentran distribuidos uniformemente al final del proceso. Se utiliza un paso de multiplicación para convertir el número de huevos encontrados a huevos por litro. Si sólo se detecta un único huevo, el recuento final puede ser exageradamente alto. El número de muestras positivas de aguas residuales tratadas se incrementa enormemente incrementado el tamaño de la muestra inicial hasta 10 litros.

### 11.2. Tiempos de sedimentación

Se puede utilizar la ley de Stokes cuando se quiere calcular los ratios de sedimentación de los huevos de nematodos en agua. A 20°C los ratios de sedimentación de los tres tipos de huevos más comúnmente encontrados son:

- *Ascaris lumbricoides*: 20 mm/min
- *Trichuris trichura*: 16 mm/min
- Uncinarias: 6 mm/min

Se recomienda que para asegurar la concentración de todos los huevos, se debe usar un recipiente con una profundidad al menos el doble del tiempo de sedimentación teórico.

### 11.3. Búffer acetoacético

El amplio trabajo desarrollado por Bailenger (1979), demuestra que la eliminación de helmintos de muestras fecales no es sólo una cuestión de sedimentación o flotación en base a la densidad relativa,



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



sino que también es muy importante el balance hidrofílico-lipofílico de los huevos de los parásitos en relación al medio de extracción. Mediante el control del pH, el balance hidrofílico-lipofílico se puede modificar para optimizar la concentración de los huevos de los parásitos. El buffer acetoacético a pH 4,5 resulta ser el más apropiado para la concentración de una amplia variedad de huevos de helmintos.

#### 11.4. Cámara de McMaster

La cámara de McMaster es un portaobjeto especializado que permite contar el número de huevos de helmintos o larvas en una cantidad conocida de una solución de flotación. El principio de la cámara de McMaster es que los huevos son suspendidos en una solución de flotación y mantenidos inmediatamente debajo del cristal superior de la cámara, mientras los residuos pesados precipitan en el fondo. Si el microscopio se enfoca en la retícula, los huevos pueden enfocarse claramente mientras que los residuos no. Mediante la búsqueda sistemática en toda la retícula, se puede contar con precisión el número de huevos en 0,15 ml de la solución de flotación.

#### 11.5. Uso de centrífugas

Muchos de los métodos publicados que involucra el uso de centrífugas citan velocidades de centrifugación en términos de fuerza centrífuga relativa. Sin embargo, en algunos artículos, la velocidad es expresada en revoluciones por min (rpm). Para convertir las rpm a fuerza, se utiliza la siguiente fórmula:

$$RCF = r (\text{rpm})^2 / k$$

donde RCF = fuerza centrífuga relativa (g),

r = radio de la centrífuga desde el eje hasta el centro del cestillo (cm),

k = 89 456.

Para convertir la fuerza a rpm:

$$\text{rpm} = \sqrt{(kRCF / r)}$$