



ADAPTares

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



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial

Interreg

Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



ADAPTares

**Adaptação às mudanças climáticas na Macaronésia a través do uso
eficiente da água e sua reutilização
(MAC/3.5b/102)**

**Control de Calidad Sanitaria del Agua Regenerada en Cabo Verde
Aspectos microbiológicos**

**Dr. Néstor J. Abreu Acosta
NERTALAB SLU**

CONTENIDOS

- ✓ Reutilización de las aguas residuales (aguas regeneradas)
 - ✓ Ventajas
 - ✓ Desventajas
- ✓ Organismos indicadores de contaminación fecal
- ✓ Microorganismos patógenos más frecuentes en aguas residuales/regeneradas
 - ✓ Bacterias patógenas
 - ✓ Protozoos patógenos
 - ✓ Nematodos (helminthos) patógenos
 - ✓ Virus entéricos
- ✓ Transmisión de patógenos por aguas residuales /regeneradas
- ✓ Características epidemiológicas a tener en cuenta en un proyecto de reutilización
- ✓ Riesgos para la salud en un plan de reutilización
- ✓ Medidas de prevención
- ✓ Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna
- ✓ Vigilancia en aguas residuales como sistema de alerta temprana de brotes de SARS-CoV-2

Reutilización de Aguas Residuales

El agua:

- Factor indispensable para la vida
- Determinante para el desarrollo de la sociedad
- Las diferentes actividades humanas precisan agua en cantidad creciente
- Calidades más restrictivas
- Desequilibrio entre la demanda y los recursos hídricos. Actuación en dos direcciones:
 - Disminuir la demanda:
 - Mejora de la gestión reduciendo pérdidas (red de distribución, concienciación social)
 - Aumento de la oferta (nuevas tecnologías para la captación y tratamiento)
- **Agua residual urbana**
 - Recurso hídrico de grandes posibilidades
 - Su recuperación debe considerarse como una etapa dentro del ciclo del agua
 - Permite disponer de un nuevo recurso hídrico
 - Conservar otros de mayor calidad para usos más restrictivos

Reutilización de Aguas Residuales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la reutilización del agua como primordial en zonas con déficit hídrico, siempre que se realice de forma que se proteja la salud pública y el medio ambiente

Reutilización plantea requerimientos técnicos.

Amplia gama de opciones de tratamiento

Alcanzar los criterios de calidad en función del uso

•Ventajas

- ✓ Impacto muy positivo para evitar aparición de brotes infecciosos
- ✓ Suministro continuo de agua (momentos de sequía)
- ✓ Aporte de nutrientes (disminución potencial de fertilizantes. Aporte de N, P, K..)
- ✓ Reducción de costes de tratamiento (tratamiento terciario por el suelo)
- ✓ Reducción del consumo de agua dulce: mayor caudal para usos más restrictivos
- ✓ Disminución de vertidos (disminución de contaminación ambiental)
- ✓ Recarga de acuíferos con la infiltración de los excedentes del riego

Reutilización de Aguas Residuales

•Desventajas

- ✓ Posible daño a la salud humana y animal por la propagación de patógenos
- ✓ Obturaciones de los emisores en los sistemas de riego por goteo (mantenimiento de la instalación de filtrado y emisores)
- ✓ No se debe almacenar el agua regenerada. Si fuera imprescindible debe aplicarse una desinfección (mantenimiento de la calidad)
- ✓ Presencia de sustancias en concentraciones tóxicas para las plantas o provocan daños ambientales (daño a las aguas subterráneas ...nitratos, metales pesados..)
- ✓ Posible daño al suelo debido a la acidificación del suelo
- ✓ Toma de precauciones durante su uso

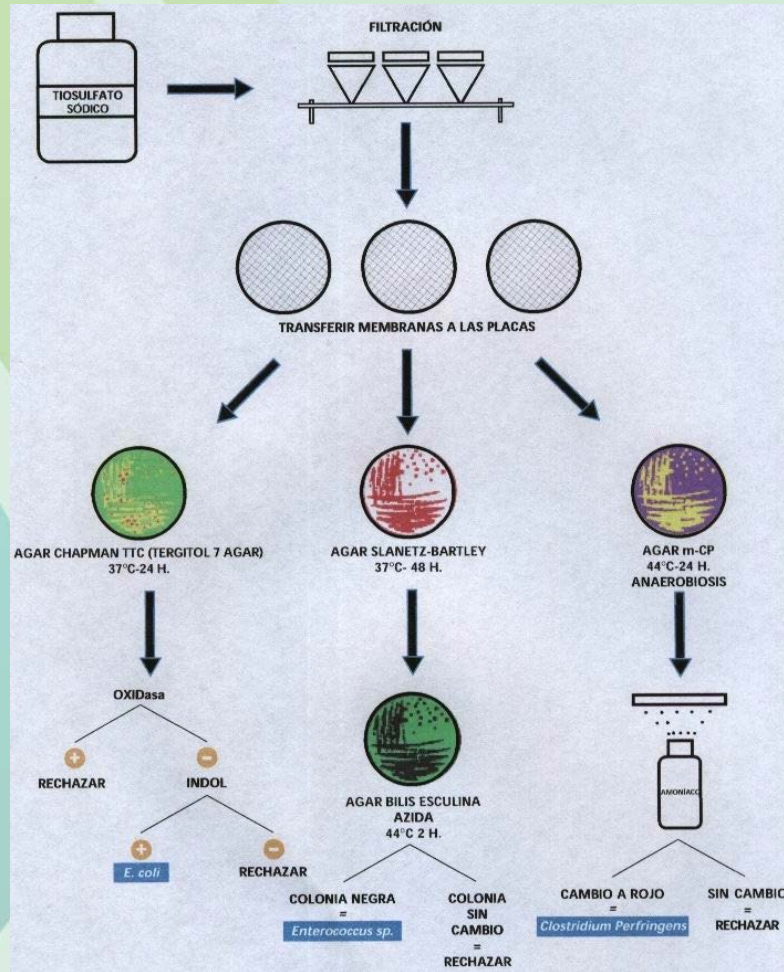
Organismos indicadores de contaminación fecal

- Dificultad en monitorizar los patógenos del agua
 - ✓ Aislamiento e identificación laboriosos
 - ✓ Gran volumen de muestra (bajo nº de patógenos)
 - ✓ Se han definido indicadores para calidad del agua
- Características de un indicador ideal:
 - ✓ Relación indicador/patógeno elevada
 - ✓ Presencia abundante en materia fecal
 - ✓ Respuesta similar a la del patógeno
 - ✓ Detección sencilla y barata con resultados precisos
 - ✓ Estable y no patógeno
 - ✓ Adecuado a todos los tipos de aguas

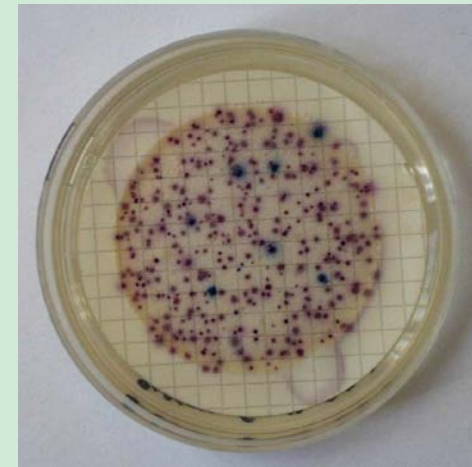
Organismos indicadores de contaminación fecal

- No existe un único organismo
- Más habituales:
 - ✓ *E. coli* (RD 1620/2007) (Decreto Regulamentar nº 4/2020)
 - ✓ Enterococos
 - ✓ *Clostridium perfringens*
 - Indicador de quistes/ooquistes
 - Modelo en ensayos de supervivencia y desinfección
- Otros:
 - *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*
 - *Aeromonas hydrophila*
 - *Bifidobacterium* y *Bacteroides fragilis* (origen de la contaminación)
 - *Pseudomonas*
- Identificación y enumeración de virus compleja y de alto coste
- Biología molecular para detección vírica (no infectividad)

Organismos indicadores de contaminación fecal



Método de filtración por membrana



Organismos indicadores de contaminación fecal

Coliformes /*Escherichia coli*

- Mejores indicadores de la contaminación fecal reciente
- No distinguen entre contaminación humana y animal
- Capacidad para sobrevivir en el ambiente. Frecuentes en aguas tropicales sin contaminar: desarrollo de nuevos indicadores para este tipo de agua
- *E. coli* fácilmente distinguible de otros coliformes fecales
- No se suelen utilizar para evaluar la efectividad del tratamiento y contaminación post-tratamiento
- *E. coli* es un indicador más específico de contaminación fecal (Decreto Regulamentar nº4/2020)
- Coliformes fecales: eliminadas en el RD 140/2003

Decreto Regulamentar
nº 4/2020



Organismos indicadores de contaminación fecal

- De origen fecal exclusivo. Heces humanas
- Anaeróbica y formadora de endosporas
- Extremadamente resistente al estrés y a la desinfección (mayor que la de otros indicadores)
- Indicador potencial de contaminación remota
- Análisis sencillo y barato
- Presencia en el agua tratada relacionada con densidades de virus, *Giardia* y *Cryptosporidium*. Indicador de eficacia de tratamiento

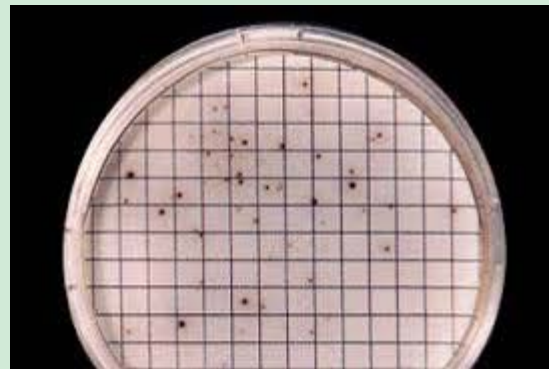
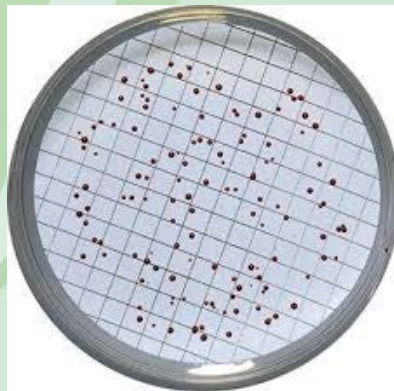
Clostridium perfringens



Organismos indicadores de contaminación fecal

Enterococos

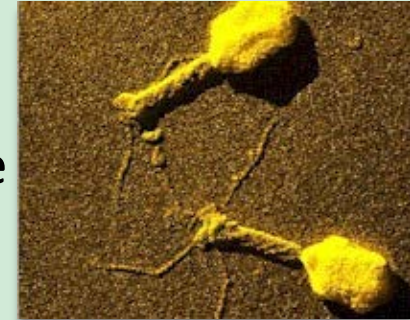
- Más específicos de contaminación humana
- *E. faecium* específico del intestino humano
- Ciertas ventajas sobre coliformes
 - Multiplicación rara en agua
 - Mayor resistencia al estrés ambiental y cloración
 - Mayor persistencia en el ambiente
- Enterococos sugeridos como indicadores de riesgo de gastroenteritis
- Posibles indicadores de la presencia de virus entéricos en el ambiente



Organismos indicadores de contaminación fecal

- **Indicadores víricos:**

- ✓ Identificación y recuento de virus: compleja y de alto coste



- ✓ Primer indicador: Poliovirus

- Cantidades muy variables en ambientes acuáticos
- Laboratorios especializados
- Obtención de resultados después de varios días

- ✓ Indicadores propuestos: Bacteriófagos

- Presencia abundante en aguas residuales y contaminadas
- Poblaciones de colifagos mayores que las de los enterovirus
- Incapacidad de multiplicación fuera del hospedador bacteriano
- Aislamiento y enumeración con métodos sencillos
- Resultados rápidos
- Resistencia similar a enterovirus frente a la desinfección

Organismos indicadores de contaminación fecal

- **Indicadores víricos:**

- ✓ **Colifagos somáticos**

- *E. coli*: adsorción somática
- Heces animales y humanas
- 10^4 - 10^6 UFP/100 ml
- Presencia en aguas no contaminadas

- ✓ **Bacteriofagos F-RNA específicos**

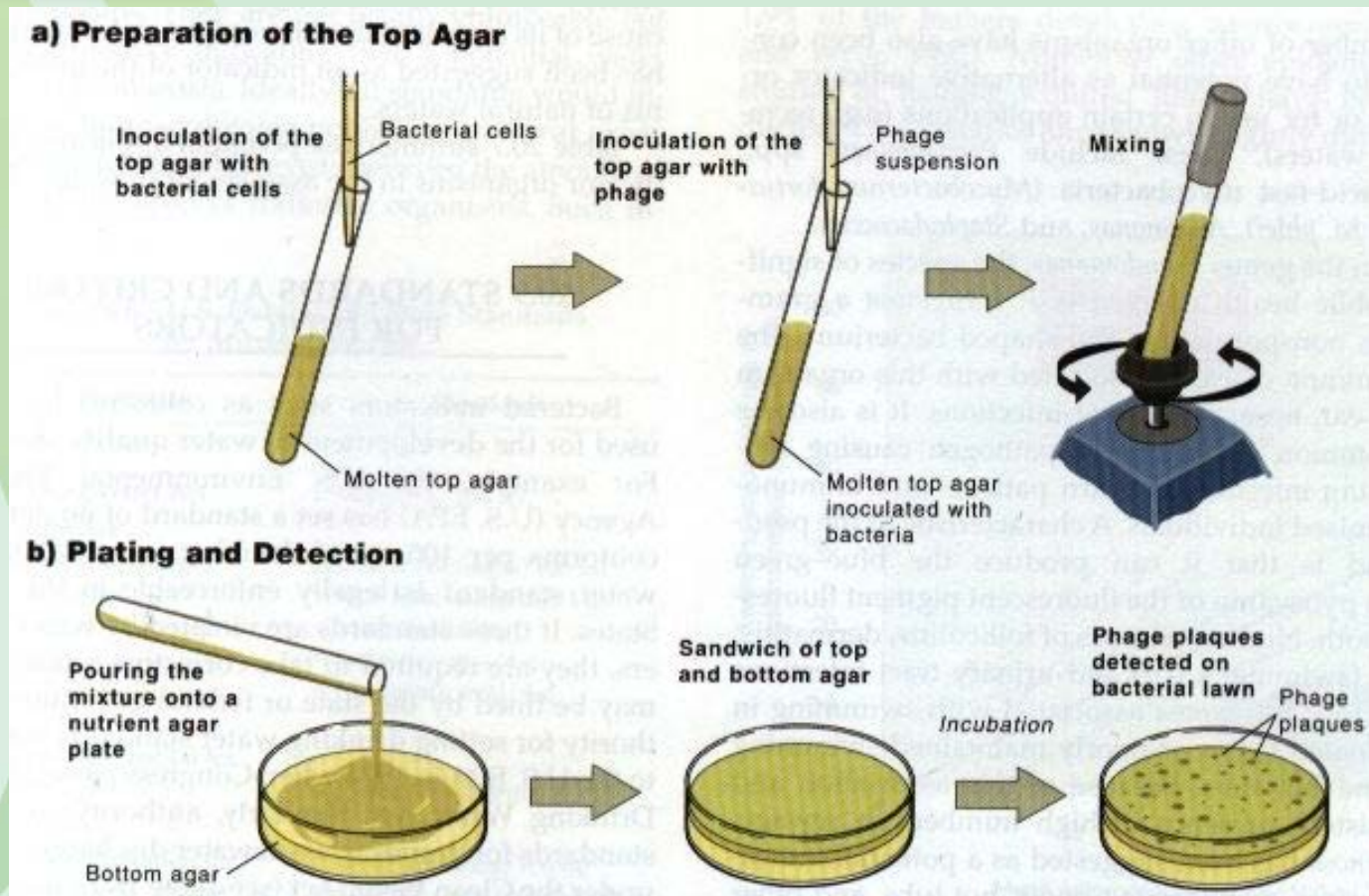
- Adsorción a través del pili sexual
- Heces animales y humanas (fuente pobre)
- 10^3 - 10^5 UFP/100 ml
- Bajo reecrecimiento

- ✓ **Bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis***

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

Organismos indicadores de contaminación fecal

Bacteriófagos:



ADAPTRES



Organismos indicadores de contaminación fecal

- Indicador de huevos de helmintos:

- ✓ *Ascaris lumbricoides* (en estudios ambientales):

- Larga persistencia en el suelo
 - No se multiplica
 - Fácil identificación
 - Nivel de parasitismo a nivel mundial alto
 - Enfermedad leve
 - Infecciones sintomáticas en un 85%
 - Dosis infectiva baja
 - Riesgo de transmisión elevado (gran cantidad de huevos)



Bacterias patógenas en AARR

- Origen fecal
 - Transmisión por vía oral
 - No se pueden multiplicar en el ambiente
 - Baja resistencia al cloro
 - Dosis infectiva alta
 - Tiempo de persistencia corto o moderado
 - Reservorios animales
- Origen ambiental (oportunistas)
 - Vía oral, inhalación, piel, mucosas, ojos, oídos, nariz
 - Se multiplican en el ambiente
 - Resistencia al cloro leve/moderada
 - Sin reservorios animales

Bacterias patógenas en AARR

Bacterias	Fuente	Periodo de incubación	Duración	Síntomas clínicos
<i>Salmonella typhi</i>	Heces, orina	7 - 28 días (14)	5 - 7 días (semanas – meses)	Fiebre, tos, nausea, dolor de cabeza, vómito, diarrea
<i>Salmonella sp.</i>	Heces	8 - 48 horas	3 - 5 días	Diarrea acuosa con sangre
<i>Shigella sp.</i>	Heces	1 - 7 días	4 - 7 días	Disentería (diarrea con sangre), fiebres altas, síntomas tóxicos, retortijones, pujos intensos e incluso convulsiones.
<i>Vibrio cholerae</i>	Heces	9 - 72 horas	3 - 4 días	Diarrea acuosa, vómito, deshidratación
<i>V. cholerae</i> No.-01	Heces	1 - 5 días	3 - 4 días	Diarrea acuosa
<i>E. coli</i> enterohemorrágica O157:H7	Heces	3 - 9 días	1 - 9 días	Diarrea acuosa con sangre y moco, dolor abdominal agudo, vómitos, no hay fiebre
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Heces	8 - 24 horas	1 - 2 semanas	Diarrea, fiebre, cefalea, mialgias, dolor abdominal, a veces las heces son mucosas y con sangre
<i>E. coli</i> enterotoxígena	Heces	5 - 48 horas	3 - 19 días	Dolores abdominales, diarrea acuosa, fiebre con escalofríos, nausea, mialgia
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Heces, orina	1- 11 días (24 - 48 horas)	1 - 21 días (9)	Dolor abdominal, diarrea con moco, sangre, fiebre, vómito
<i>Campylobacter jejuni</i>	Heces	2 - 5 días (42 - 72 horas)	7 - 10 días	Diarrea, dolores abdominales, fiebre y algunas veces heces fecales con sangre, dolor de cabeza
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Heces	20 - 24 horas	1 - 2 días	Fiebre, escalofríos, dolor abdominal, nausea, diarrea o vómito
<i>Aeromonas sp.</i>	Heces	Desconocido	1 - 7 días	Diarrea, dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza y colitis, las heces son acuosas y no son sanguinolentas

Bacterias patógenas en AARR

- Nº de bacterias/gr :

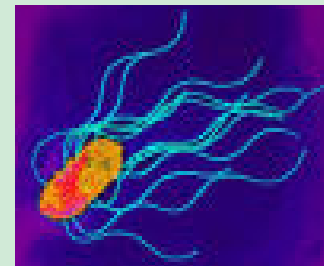
- *E. coli*: 10^8
- *Salmonella* sp.: 10^6
- *C. jejuni*: 10^7
- *V. cholerae*: 10^6

- Tiempo de supervivencia:

- *E. coli*: 90 días
- *Salmonella* sp. : 90 días
- *Shigella* sp.: 30 días
- *C. jejuni* : 7 días
- *V. cholerae*: 30 días



Campylobacter jejuni



Salmonella sp.

- Dosis infectiva:

- *E. coli*: 10^2 - 10^9
- *Salmonella* spp.: 10^7
- *V. cholerae*: 10^3

	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Bacterias	0-1 log ₁₀	1-2 log ₁₀	0-2 log ₁₀	0-2 log ₁₀	1-2 log ₁₀	2-6 log ₁₀	1-6 log ₁₀

Bacterias patógenas en AARR

- Bacterias emergentes:

- *Escherichia coli* 0157:H7

- Productora de una toxina causante de graves patologías
- Colitis hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico
- Asociada principalmente a ganado y al consumo de alimentos
- Contaminación de las fuentes de agua por:
 - Lluvias torrenciales, escorrentías agrícolas
 - Desbordamiento de aguas residuales
 - Mayor vulnerabilidad en el caso de pozos poco profundos
- No hidroliza el MUG (4 metilumbeliferil-B-D-glucorónido)
- Detección mediante filtración por membrana complicada
- No fermenta el sorbitol
- Confirmación con API o anticuerpos



E. coli

Bacterias patógenas en AARR

- Bacterias emergentes:

- *Helicobacter pylori*

- Gastritis /úlceras duodenales / carcinoma gástrico
 - Alto % de población infectada
 - Relación alta con características socioculturales y exposiciones ambientales
 - Presente en perros y gatos. Vacuno (antígenos)
 - Escasa información
 - Posible transmisión fecal oral
 - Resistencia a las prácticas de desinfección habituales
 - Detección en aguas complicada (estado viable no cultivable)
 - El agua constituye un intermediario en la transmisión oral-fecal
 - Puede permanecer largos periodos de tiempo (75 h a 10°C, 2 años a 4°C)
 - Ingestión accidental a través del baño o alimentos contaminados
 - Desarrollo de biopelículas en sistemas de distribución: riesgo

Bacterias patógenas en AARR

- Bacterias emergentes:
 - *Mycobacterium (bovis y avium)*
 - Patógeno intracelular
 - Ingestión de leche y otros alimentos
 - Varios reservorios animales
 - Manifestaciones clínicas variables
 - Cierta resistencia a la desinfección
 - Presentes en el interior de protozoos (*Acanthamoeba* sp)
 - Detección en aguas complicada (estado latente)
 - Detección por medios selectivos e inhibitorios
 - Tratamiento para eliminación la flora acompañante
 - Periodo largo de incubación
 - El medio ambiente funciona como reservorio

Bacterias patógenas en AARR

Survival of *Mycobacterium bovis* in feed, water and soil

Bovine TB is caused by the bacterium *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Infected cattle or wildlife may shed *M. bovis* in their faeces, urine or saliva, which can contaminate the farm environment. Studying *M. bovis* survival in the environment is challenging, but several studies using samples artificially spiked with *M. bovis* have investigated survival under a range of conditions. Survival of the bacteria is typically higher in cool, moist, dark conditions and lower in hot, dry, sunny conditions.

How long can *M. bovis* survive in feed?

Studies suggest that *M. bovis* can survive on hay and maize for a few days in spring/summer, but for up to 40 days in colder overcast conditions in autumn/winter [1]. Recent research suggests *M. bovis* can also survive for several days in the field on salt/mineral licks [2].



How long can *M. bovis* survive in water or soil?

M. bovis can survive in water for about 20-60 days depending on the conditions [1]. Studies have shown that *M. bovis* can survive in soil for about 14 days in summer [1], 3 months in winter [1] and potentially much longer if stored in cold dark conditions [3]. Studies in Spain have also identified *M. bovis* in mud and water in natural water



ADAPTRES



Bacterias patógenas en AARR

Journal of
Applied Microbiology



Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis

E. Barbier^{1,2}, M.L. Boschioli³, E. Gueneau⁴, M. Rochelet², A. Payne¹, K. de Cruz³, A.L. Blieux⁵, C. Fossot⁶ and A. Hartmann¹

Conclusions: The development of molecular assays permitted testing of several types of environmental samples including spring water, sediment samples and soils from badger setts entrance located in the vicinity of these farms, which were repeatedly contaminated with *Myco. bovis* (up to 8.7×10^3 gene copies per gram of badger sett soil). For the first time, direct spoligotyping of soil DNA enabled identification of *Myco. bovis* genotypes from environmental matrices.

Significance and Impact of the Study: All together, these results suggest that *Myco. bovis* occurs at low levels in environmental matrices in Côte d'Or within the bTB-infected area. Drinking contaminated water or inhaling contaminated bioaerosols might explain cattle infection in some cases.



ADAPTRES



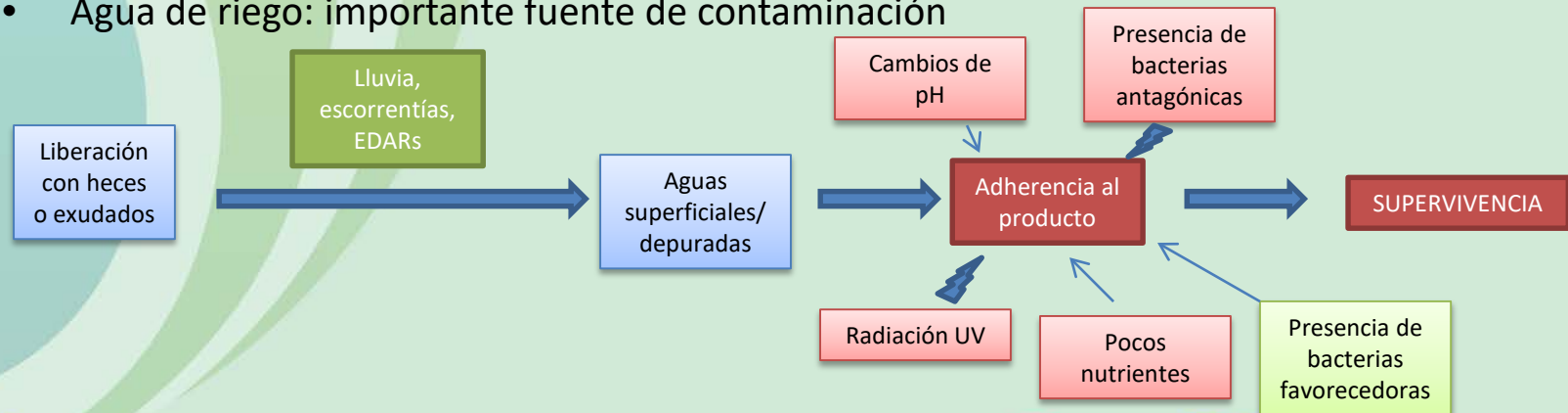
Salmonella spp.

- Familia *Enterobacteriaceae*
- Bacilos cortos gramnegativos no esporulados
- Anaerobios facultativos
- Móviles (flagelos peritriticos)
- Nomenclatura compleja (identificación serológica, características bioquímicas..)
- Estudios hibridación ADN-ADN: todos los serotipos relacionados
- Estudios genéticos:

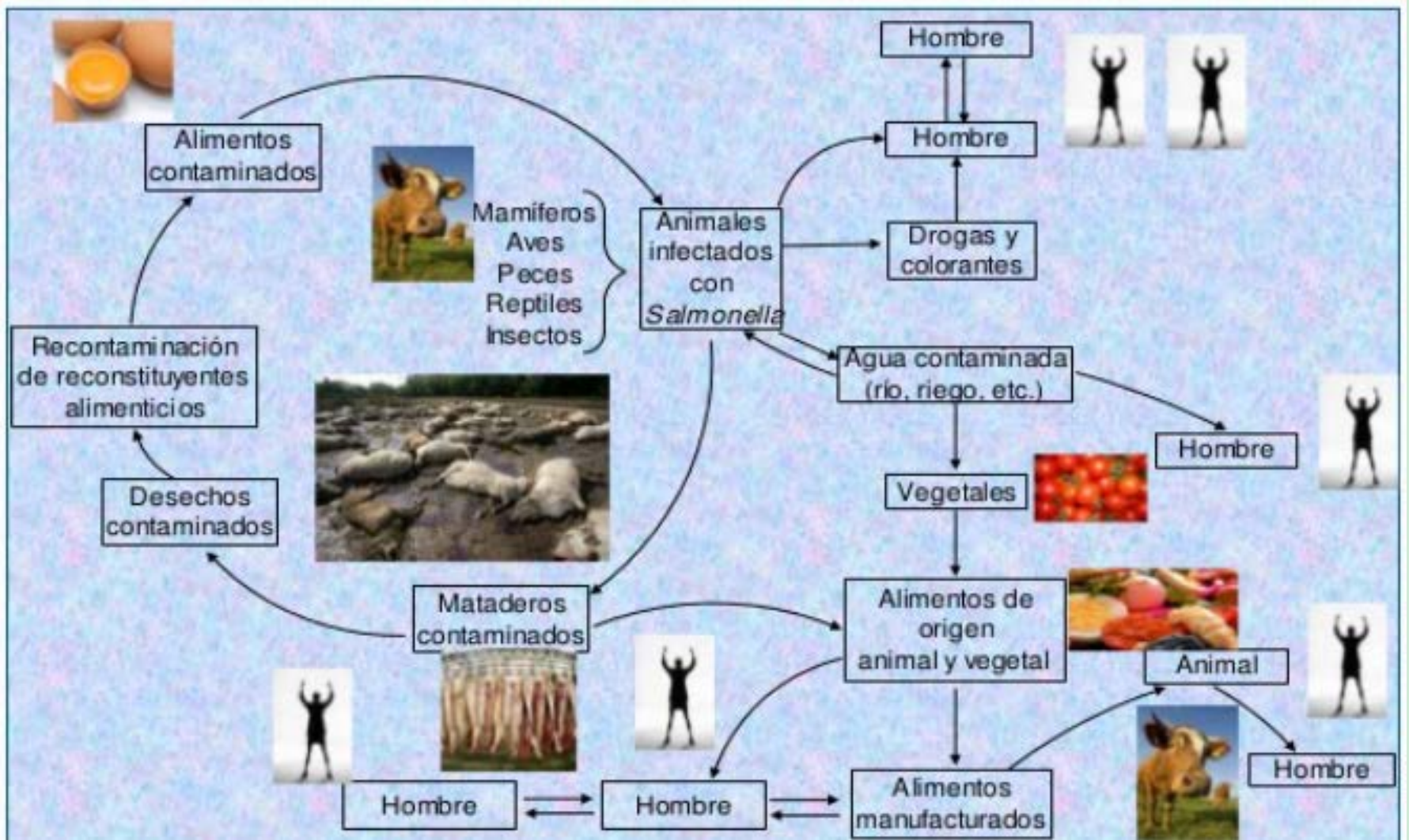
Especie	Subespecie
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I) <i>salamae</i> (II) <i>arizonae</i> (IIa) <i>diarizonae</i> (IIIb) <i>houtenae</i> (IV) <i>indica</i> (VI)
<i>Samonella bongori</i>	

Salmonella spp.

- *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* (A y C), *S. Sendai*: fiebres entéricas (hombre)
- Resto de serovariedades: zoonóticas (salmonelosis no tifoidea)
- Habitante natural del tracto gastrointestinal de numerosos animales
- Manifestaciones clínicas amplias:
 - Fiebres entéricas, gastroenteritis, bacteriemia, infecciones localizadas
 - Portador crónico
- 93,8 millones de casos, 155.000 muertes
- Principalmente por la ingestión de alimentos contaminados
 - Patógeno principal en brotes con productos agrícolas (abonos y agua)
 - Agua de riego: importante fuente de contaminación



Salmonella spp.



Salmonella spp.

- Presentes en todos los ambientes acuáticos
- En aguas residuales 10^3 - 10^4 UFC/L (incluso después de un trat. 3^{ro})
- Sobreviven en sedimentos y suelos (supervivencia en ambientes acuáticos)
- Recrecimiento fuera de hospedadores (biofilms, fangos de depuradoras y compost)

Salmonella occurrence in surface waters.

Level and frequency positive samples % (total samples)	Surface water	Dominant impact in the analyzed water	Country	Survey extent	References
8.5% (342)	River water	Mainly influenced by rainfall runoff and drainage from agricultural land	Canada	9 sampling sites, 2 year	Jokinen et al. (2011)
13% (186)	River water	Mixed	Canada	4 sampling sites, 2 years	Jokinen et al. (2010)
10^4 - 10^6 CFU/100 mL ^a	River water	Mixed comprising untreated sewage of residential setup	India	8 sampling sites, 1 day	Jyoti et al. (2010)
87% (8)	Four differently impacted watersheds systems	Swine production Residential/industrial Forestry Crop agriculture	USA	4 sampling sites, 2 years	Patchanee et al. (2010)
54% (86)	River and estuaries	Not described	USA	10 sampling sites, 14 month	Schriewer et al. (2010)
7% (143)	Urban pond and tidal creeks	Mixed: WWTPs effluents, surface runoff, agricultural	Australia	8 sampling sites, 2 months	Ahmed et al. (2009)
3% (32)	Lake and river water	Not described	USA	numerous sampling sites, 2 years	Byappanahalli et al. (2009)
0.002-0.017 MPN/mL	Pond	Urban	Czech Republic	2 sampling sites, 1 year	Dolejská et al. (2009)
42% (19)	River watershed	Mixed: mainly forested and agricultural in a area with high incidence of salmonellosis mixed	USA	6 sampling sites, 12 months	Haley et al. (2009)
16% (87)	River and streams		Canada	24 sampling sites, 3 years	Wilkes et al. (2009)
2.5-36.3 MPN/L ^b	Small river	Mainly rural area	USA	82 sampling sites, 1 day	Meinersmann et al. (2008)
79% (72)	Urban canals/river and recreational lakes ^d	Not described	Netherlands	8 sampling sites, 1 year	Schets et al. (2008)
4-15% (1600) ^c	Stream water Puddles	Mixed comprising WWTP discharge	Mexico	Random sampling, 2 years	Simental and Martínez-Urtaza (2008)
75% (83)	Rivers and lakes Fresh water recreational and water supply sites	Mixed: birds, dairy farming, municipal, sheep/pastoral, forestry undeveloped	New Zealand	25 sampling sites, 15 month	Till et al. (2008)
3.8% (79)	River and pond around Sapporo city	Mixed: WWTPs effluents, urban sewage, cow and pig farms	Japan	5 sampling sites, 3 months	Savitchcheva et al. (2007)
10.6% (216)	River ^f	Mixed: Urban/industrial comprising direct sewage discharge	Italy	8 sampling sites, 2 years	Bonadonna et al. (2006)
17.6% (17)	River, borehole	Animal and human activities, human and animal feces	South Africa	8 sampling sites	Obi et al. (2004)
10% (725) ^e	River and irrigation water		Canada	16-21 sampling sites, 2 years	Gannon et al. (2004)
53% (30)	River	Mixed: Urban/industrial, WWTP discharge agricultural	Italy	1 sampling site, 1 year	Bonadonna et al. (2003)
10-10 ⁴ MPN/100 mL	River water	Runoff from agricultural land and pastures, human and animal feces	Africa	Weekly sampling, 5 months	Obi, Potgieter, Bessong, and Matsaung (2003)
100% (>300)	River	Mixed	France		Lemarchand and Lebaron (2003)
75% (375) ^g					
5.4% (802)					
10^2 - 10^5 MPN/100 mL					
100% (10)					
57% (14)					
0.06-42.4 CFU/L					
100% (8)					



Salmonella spp.

Agua de riego: Interés como fuente de contaminación

- Consumo de productos frescos: relación con brotes por alimentos contaminados
- El riego:
 - Factor crítico en la producción de frutas y verduras (presencia de *Salmonella*)
 - Principal fuente de contaminación de productos frescos
 - Aguas superficiales y subterráneas, residuales tratadas

Journal of Food Protection, Vol. 72, No. 5, 2009, Pages 1094–1098
Copyright ©, International Association for Food Protection

Research Note

An Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Litchfield Infection in Australia Linked to Consumption of Contaminated Papaya

ROBYN GIBBS,^{1,2*} NEVADA PINGAULT,^{1,2} TERRY MAZZUCHELLI,¹ LYN O'REILLY,³ BRIAN MacKENZIE,³
JENNIFER GREEN,³ RAY MOGYOROSY,³ RUSSELL STAFFORD,^{2,4} ROBERT BELL,^{2,4} LESTER HILEY,⁴
KATHLEEN FULLERTON,^{2,5} AND PAUL VAN BUYNDER¹

¹Department of Health Western Australia, P.O. Box 8172, Perth Business Centre, Western Australia 6849, Australia; ²OzFoodNet Working Group, Department of Health and Ageing, Office of Health Protection, Canberra, Australian Capital Territory, Australia; ³PathWest Laboratory Medicine WA, Locked Bag 2009, Nedlands, Western Australia 6909, Australia; ⁴Queensland Health, GPO Box 48, Brisbane, Queensland 4001, Australia; and ⁵Department of Health and Ageing, MDP 14, GPO Box 9848, Canberra, Australian Capital Territory 2601, Australia

MS 08-328: Received 8 July 2008/Accepted 5 December 2008

Papayas lavadas con agua de río

Salmonella spp.

Agua de riego: Interés como fuente de contaminación

Epidemiol. Infect. (2008), 136, 157–165. © 2007 Cambridge University Press
doi:10.1017/S095026880700859X Printed in the United Kingdom

Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005

S. K. GREENE^{1,2*}, E. R. DALY³, E. A. TALBOT^{3,4}, L. J. DEMMA^{1,5},
S. HOLZBAUER^{1,5}, N. J. PATEL¹, T. A. HILL⁶, M. O. WALDERHAUG⁶,
R. M. HOEKSTRA¹, M. F. LYNCH¹ AND J. A. PAINTER¹

Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 11, 2010, Pages 1967–1974

Analysis of Tomato and Jalapeño and Serrano Pepper Imports into the United States from Mexico before and during a National Outbreak of *Salmonella* Serotype Saintpaul Infections in 2008

KARL C. KLONTZ,^{1*} JOSHUA C. KLONTZ,² RAJAL K. MODY,³ AND ROBERT M. HOEKSTRA¹

¹Office of Food Defense, Communications, and Emergency Response, HFS-005, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, College Park, Maryland 20740; ²Harvey Mudd College, 340 East Foothill Boulevard, Claremont, California 91711; and ³Division of Foodborne, Bacterial, and Mycotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, Georgia 30333, USA

MS 10-130: Received 28 March 2010/Accepted 5 July 2010

Mismas cepas bacterianas presentes en el agua almacenada para el riego

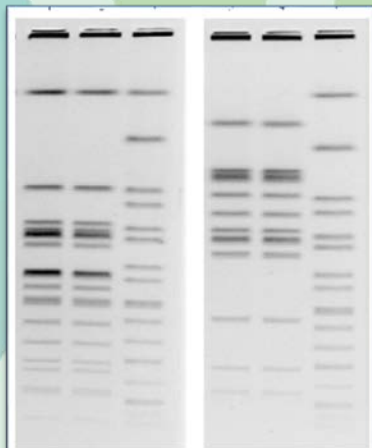


Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Sal-*



Diversity and Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* Isolates from Surface Water in Southeastern United States

Baoguang Li,^a George Vellidis,^b Huanli Liu,^{**} Michele Jay-Russell,^c Shaohua Zhao,^d Zonglin Hu,^{**} Anita Wright,^e Christopher A. Elkins^a

Division of Molecular Biology, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. FDA, Laurel, Maryland, USA^a; University of Georgia, Tifton, Georgia, USA^b; University of California, Davis, Western Center for Food Safety, Davis, California, USA^c; Center for Veterinary Medicine, U.S. FDA, Laurel Maryland, USA^d; University of Florida, Gainesville, Florida, USA^e

A study of prevalence, diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* in surface water in the southeastern United States was conducted. A new scheme was developed for recovery of *Salmonella* from irrigation pond water and compared with the FDA Bacteriological Analytical Manual (8th ed., 2013) (BAM) method. PFGE and antimicrobial resistance were used to

Salmonella spp.

Agua de riego: Interés como fuente de contaminación

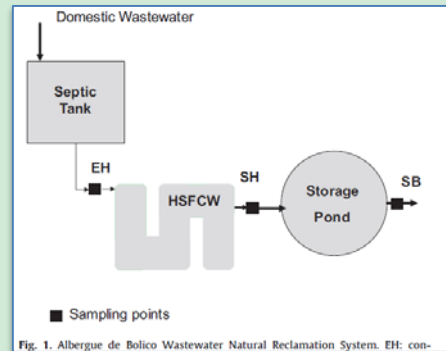
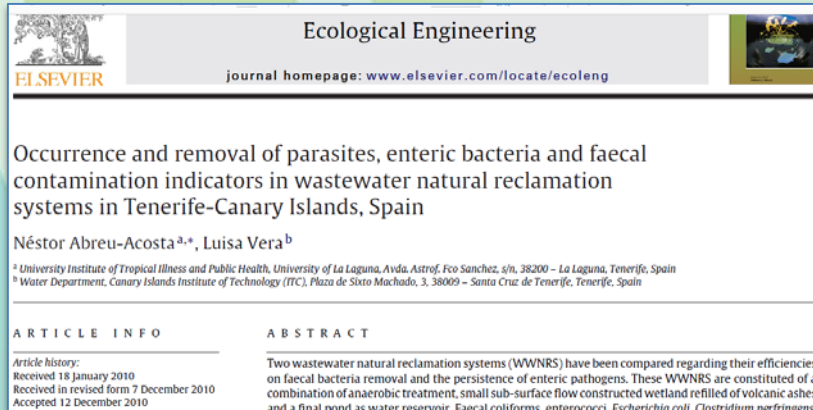
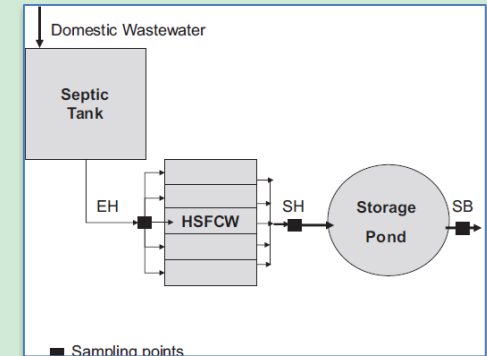


Fig. 1. Albergue de Bolicó Wastewater Natural Reclamation System. EH: con-



Sampling points

Table 1
Presence/absence of pathogen microorganisms in water samples with various levels of faecal pollution in Albergue de Bolicó Wastewater Treatment System.

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

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.

Table 2
Presence/absence of pathogen microorganisms in water samples with various levels of faecal pollution in Carrizal Alto Wastewater Treatment System.

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

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.



ADAPTABLES

MAC 2014-2020
Cooperação Territorial

Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



Salmonella spp.

Agua de riego: Interés como fuente de contaminación

RESULTADOS

1.- CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y PARASITOLÓGICA DE AGUAS DEPURADAS Y REGENERADAS DE TENERIFE

161 muestras / 51 + para *Salmonella* spp. (31,67%)

S. Enteritidis en 24 muestras (14,37%)

S. Tiphymurium en 2 muestras (1,20%)

Agua regenerada para riego: 5,50% positivas

% + similar todas las
muestras con *E. coli* > a
200 UFC/ 100 ml

Tabla 37: Presencia/ausencia de *Salmonella* en muestras con distintos niveles de *E. coli*

<i>Salmonella</i>	Niveles de <i>E. coli</i> (ufc/ 100 ml)			
	<200	200-1000	1000-10000	>10000
Presencia	0	6 (33,33%)	11 (34,37%)	33 (38,37%)
Ausencia	11	12	21	53
Total	11	18	32	86

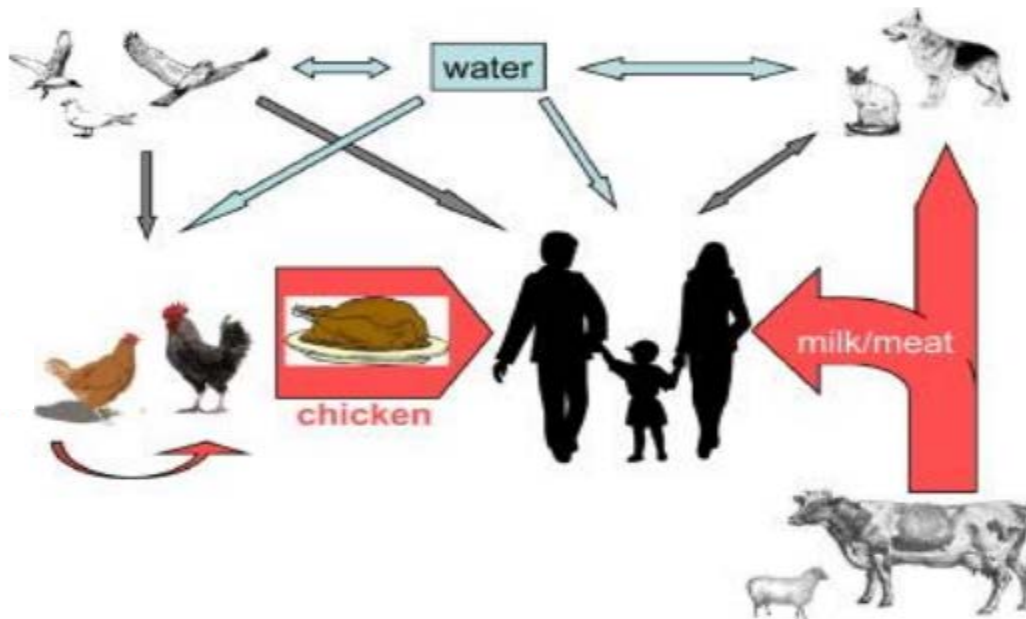
Campylobacter spp.

- Bacterias termotolerantes, bacilos, con forma de S o curva
- Género con 17 especies y 6 subespecies:
 - Especies más comunes *C. jejuni* (subesp *jejuni*), *C. coli*
 - Otras especies: *C. lari* y *C. upsaliensis*
- Dosis infectiva baja
- No produce enfermedad en los animales
- Síntomas clínicos: diarrea (sanguinolenta), dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza , náuseas y/o vómitos.

-FUENTES Y TRANSMISIÓN:

- ✓ Ampliamente distribuido en la naturaleza y animales de sangre caliente.
- ✓ Prevalentes en animales para consumo (pollos, vacuno, cerdo y oveja) y de compañía.
- ✓ Contaminación por contacto con las heces de los animales.
- ✓ Numerosos de los casos son esporádicos por no presentar un pauta discernible
- ✓ Vía principal: Transmisión por el agua o hielo (ingestión, aguas recreativas)
 - Vía muy común
 - Las aguas superficiales reciben heces de animales
 - Las agua subterráneas tienen menos probabilidad de contaminación
 - Presencia de *C. jejuni* y ausencia de coliformes

Campylobacter spp.

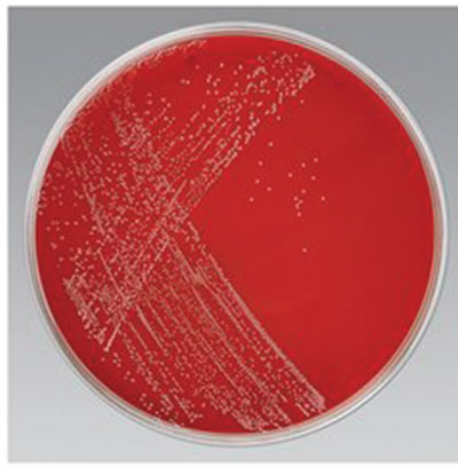
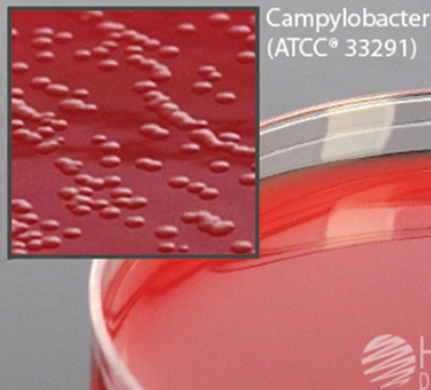


Rutas de infección más comunes en humanos

La contaminación por leche
En países donde se consume
No pasteurizada.

(Wilson et al., 2008)

Campylobacter Blood Agar



Campylobacter spp.

RESEARCH

Hazards of Healthy Living: Bottled Water and Salad Vegetables as Risk Factors for *Campylobacter* Infection

Meirion R. Evans,* C. Donald Ribeiro,† and Roland L. Salmon‡

- Comparación de 213 pacientes de casos esporádicos de *Campylobacter*
- Se obtuvo información sobre antecedentes alimentarios, contacto con animales, viajes al extranjero, actividades de ocio, afecciones médicas y uso de medicamentos. Comer pollo, comer verduras en ensalada, beber agua embotellada y el contacto directo con vacas o terneros se asociaron independientemente con la infección.
- Comer pollo es un factor de riesgo bien establecido, pero consumir ensalada y agua embotellada no lo es.
- La asociación con la ensalada puede explicarse por la contaminación cruzada de los alimentos dentro del hogar
- Existe la posibilidad de que el agua mineral natural sea un factor de riesgo para esta infección . Amplias implicaciones para la salud pública

Campylobacter spp.

Agua de riego: Interés como fuente de contaminación

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

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

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

^a University Institute of Tropical Illness and Public Health, University of La Laguna, Avda. Astrof. Fco Sanchez, s/n, 38200 - La Laguna, Tenerife, Spain
^b Water Department, Canary Islands Institute of Technology (ITC), Plaza de Sixto Machado, 3, 38009 - Santa Cruz de Tenerife, Tenerife, Spain

ARTICLE INFO **ABSTRACT**

Article history:
Received 18 January 2010
Received in revised form 7 December 2010
Accepted 12 December 2010

Two wastewater natural reclamation systems (WWNRS) have been compared regarding their efficiencies on faecal bacteria removal and the persistence of enteric pathogens. These WWNRS are constituted of a combination of anaerobic treatment, small sub-surface flow constructed wetland refilled of volcanic ashes and a final pond as water reservoir. Faecal coliforms, enterococci, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*,

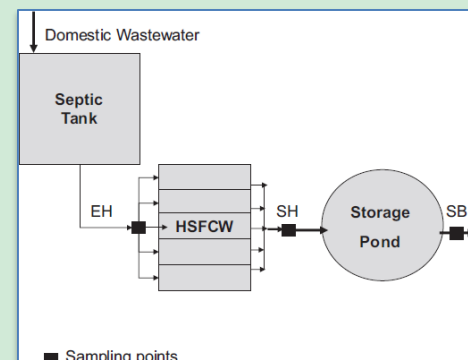
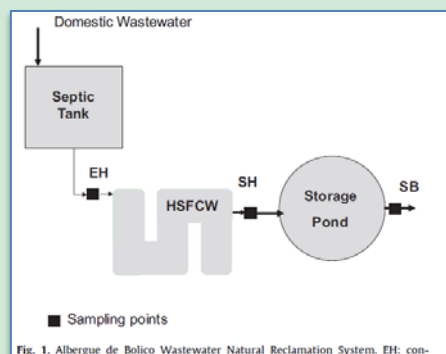


Table 1
Presence/absence of pathogen microorganisms in water samples with various levels of faecal pollution in Albergue de Bolicó Wastewater Treatment System.

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

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.

Table 2
Presence/absence of pathogen microorganisms in water samples with various levels of faecal pollution in Carrizal Alto Wastewater Treatment System.

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

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.



ADAPTADES

MAC 2014-2020
Cooperação Territorial

Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



Campylobacter spp.

Agua de riego: Interés como fuente de contaminación

RESULTADOS

1.- CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y PARASITOLÓGICA DE AGUAS DEPURADAS Y REGENERADAS DE TENERIFE

93 muestras / 17 + para *Campylobacter* spp. (18,27%)

C. coli en 14 muestras (82,35%)

C. jejuni en 3 muestras (17,65%)

Agua regenerada para riego: 44,44% positivas (*C. coli*)

% + similar todas las
muestras con *E. coli* > a
1000 UFC/ 100 ml

Tabla 39: Presencia/ausencia de *Campylobacter* en muestras con distintos niveles de *E. coli*

<i>Campylobacter</i>	Niveles de <i>E. coli</i> (ufc/ 100 ml)			
	<200	200-1000	1000-10000	>10000
Presencia	0	0	4 (17,39%)	10 (16,95%)
Ausencia	3	8	19	49
Total	3	8	23	59

Listeria monocytogenes

- Bacilos cortos gram +, regulares no esporulados, dispuestos de forma individual o cadenas cortas
- Anaerobios facultativos, intracelulares
- Muy extendidas en el medio ambiente, suelos, alimentos frescos y procesados
- Animales portadores sanos
- Alimentos principal vía de transmisión
- Infección de importancia de salud pública
 - Afecta principalmente a personas avanzada edad, embarazadas, recién nacidos e inmunodeprimidos
- Síntomas:
 - Fiebre, dolores musculares, síntomas gastrointestinales
 - Si hay propagación al SN: dolor de cabeza, rigidez de cuello, confusión, pérdidas del equilibrio o convulsiones
 - Mujeres embarazadas: Similar a la gripe, aborto, parto prematuro, infección del recién nacido.
- Agua:
 - Contaminada con heces o suelos contaminados y llega a los alimentos

Listeria monocytogenes

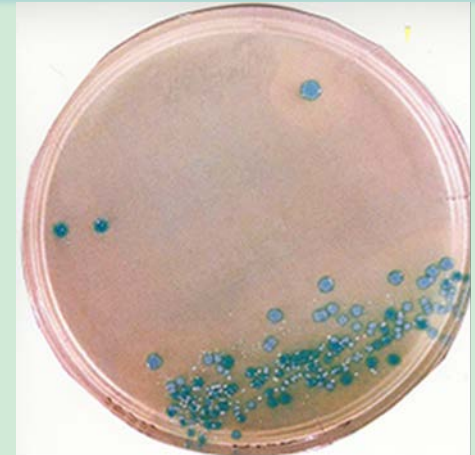
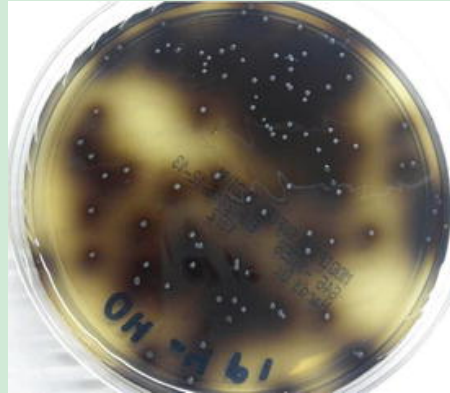


**ELECTRONIC
JOURNAL
OF POLISH
AGRICULTURAL
UNIVERSITIES**

2003
Volume 6
Issue 2
**Series
ENVIRONMENTAL
DEVELOPMENT**

Copyright © Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, ISSN 1505-0297
CZESZEJKO K., BOGUSŁAWSKA-WĄS E., DĄBROWSKI W., KABAN S., UMAŃSKI R. 2003. PREVALENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN MUNICIPAL AND INDUSTRIAL SEWAGE *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, Environmental Development, Volume 6, Issue 2.
Available Online <http://www.ejpaui.media.pl>

PREVALENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN MUNICIPAL AND INDUSTRIAL SEWAGE



- ✓ Número total de muestras: 60 de aguas residuales tratadas y no tratadas (municipales e industriales)
- ✓ Se recolectaron en el punto de descarga de EDAR y en una planta de procesamiento avícola
- ✓ Análisis microbiológicos : *Listeria* sp, coliformes fecales y recuento microbiano total en placas de agar a 20 ° C
- ✓ Resultados:
 - Falta de correlación entre el indicador de contaminación fecal y *Listeria* sp.
 - Especies de *Listeria* dominante: *Listeria monocytogenes*

Legionella spp.

- ✓ Pequeños bacilos gramnegativos con exigentes requerimientos de crecimiento
- ✓ Aerobios estrictos, crecen a Tª de 20-42°C (>50°C no se multiplica; <20°C latente)
- ✓ Bacteria ambiental que vive en aguas superficiales (flora bacteriana)
- ✓ Coloniza los sistemas de abastecimiento y saneamiento
- ✓ Vive en ambientes húmedos y se transmite por el aire
- ✓ Capaces de crecer en agar tamponado de levadura, carbón activo, con cisteína y sales de Fe
- ✓ 61 especies, 25 producen infección en el hombre
- ✓ *Legionella pneumophila*: 15 serogrupos diferentes

Tabla A.1 – Especies de *Legionella* asociadas con la enfermedad

<i>L. anisa</i>	<i>L. erythra</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. pneumophila</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. feeleeii</i>	<i>L. lytica</i>	<i>L. sainthelensi</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. maceachernii</i>	<i>L. steelei</i>
<i>L. cardiaca</i>	<i>L. hackeliae</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. tusconensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. jordanis</i>	<i>L. nagasakiensis</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. clemensonensis</i>	<i>L. lansingensis</i>	<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. parisiensis</i>	

NOTA Además, la especie *L. waltersii* ha sido detectada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una muestra clínica.

Decreto Reglamentar
nº 4/2020

Legionella spp.

- ✓ Las zonas de agua estancadas idóneas para su multiplicación
- ✓ Acumulación de nutrientes favorece su crecimiento (presencia de lodos, materia orgánica, materia de corrosión)
- ✓ **Mecanismo de transmisión:**
 - ✓ No se transmite por ingestión (alimentos o agua)
 - ✓ No se transmite de persona a persona. No es zoonótica
 - ✓ No se transmite por el vapor de agua
 - ✓ Se transmite por el aire
 - ✓ La dispersión aumenta con la formación de aerosoles (pequeñas gotas)
 - ✓ Cuanto más pequeñas (<50 µm) más tiempo quedan suspendidas (aumento probabilidades de ser inhaladas)
- ✓ Pueden desarrollarse dentro de protozoos bajo condiciones desfavorables: *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella* sp, *Naegleria* sp. Protección frente a biocidas
- ✓ Incrustaciones calcáreas: favorecen la supervivencia frente a biocidas

Legionella spp.



The screenshot shows the top portion of a CDC Emerging Infectious Diseases (EID) journal article page. At the top left is the CDC logo and the text 'Centers for Disease Control and Prevention' and 'CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People™'. To the right is a search bar. Below this is the journal title 'EMERGING INFECTIOUS DISEASES®' in large blue letters, with the ISSN '1080-6059' to its right. A breadcrumb trail reads 'EID Journal > Volume 24 > Number 10—October 2018 > Main Article'. Social media icons for Facebook, Twitter, LinkedIn, and a generic share icon are on the right. The article title is 'Two Community Clusters of Legionnaires' Disease Directly Linked to a Biologic Wastewater Treatment Plant, the Netherlands'. The authors listed are Anna D. Loenenbach, Christian Beulens, Sjoerd M. Euser, Jeroen P.G. van Leuken, Ben Bom, Wim van der Hoek, Ana Maria de Roda Husman, Wilhelmina L.M. Ruijs, Alvin A. Bartels, Ariene Rietveld, Jeroen W. den Boer, and Petra S. Brandsema. On the right side of the article title, there is a box titled 'On This Page' with a link 'The Study'.

CDC Centers for Disease Control and Prevention
CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People™

Search

EMERGING INFECTIOUS DISEASES® ISSN: 1080-6059

EID Journal > Volume 24 > Number 10—October 2018 > Main Article

Volume 24, Number 10—October 2018

Dispatch

Two Community Clusters of Legionnaires' Disease Directly Linked to a Biologic Wastewater Treatment Plant, the Netherlands

Anna D. Loenenbach, Christian Beulens, Sjoerd M. Euser, Jeroen P.G. van Leuken, Ben Bom, Wim van der Hoek, Ana Maria de Roda Husman, Wilhelmina L.M. Ruijs, Alvin A. Bartels, Ariene Rietveld, Jeroen W. den Boer, and Petra S. Brandsema

On This Page

[The Study](#)

Se identificó una planta de tratamiento biológico de aguas residuales como una fuente común de 2 brotes consecutivos de Legionelosis en los Países Bajos en 2016 y 2017. El estudio de secuencias y el modelado de transmisión indicaron transmisión directa y a larga distancia de *Legionella*, lo que indica que este tipo de fuente también debe investigarse en casos esporádicos de enfermedad del legionario.

Legionella spp.

Kusnetsov et al. BMC Infectious Diseases 2010, 10:343
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/343>



CASE REPORT

Open Access

Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: a case report

Jaana Kusnetsov^{1*}, Liisa-Kaarina Neuvonen², Timo Korpio³, Søren A Uldum⁴, Silja Mentula⁵, Tuula Putus⁶, Nhu Nguyen Tran Minh⁷, Kari-Pekka Martimo⁸

- Dos casos de neumonía severa en empleados que trabajaban en dos plantas distintas en Finlandia en 2006.
- Se utilizaron pruebas de antígeno urinario y serológico de Legionella para diagnosticar la enfermedad en los empleados sintomáticos que habían trabajado en, o cerca de, plantas de tratamiento de aguas residuales
- Los resultados indicaron una infección por *Legionella*, por lo que se estudiaron con más detalle los sistemas de aguas residuales y de agua doméstica.
- **Caso A:** infección causada por el serogrupo 1 de *L. pneumophila*.
 - Exposición a *Legionella* mientras se instalaba una bomba en un depósito de posclarificación en la EDAR de la planta A
 - Agua y lodos contenían altas concentraciones de *L. pneumophila* serogrupo 1, además del 3 y 13
- **Caso B:** Operario que trabajaba a 200 metros a sotavento de una EDAR, con lodos activados y torres de enfriamiento.
 - Infección causada por el serogrupo 2 de *L. pneumophila*.
 - Sólo presente en la torre de enfriamiento de toda la EDAR
 - La cuba de lodos activos produjo un crecimiento abundante del serogrupo 5 de *L. pneumophila* y de *L. rubrilucens*

Bacterias patógenas

Método de detección

- Fase de resucitación
- Fase de enriquecimiento
- Fase de crecimiento selectivo
- Identificación:
 - Bioquímica
 - Biología molecular



Protozoos parásitos

- Parásitos obligados
- Ciclo en un solo hospedador: monoxenos
- Ciclo en más de un hospedador: heteroxenos
- Producen enfermedades muy variadas y diferente gravedad
- Diversas localizaciones
 - Cavidades abiertas: Tubo digestivo, vagina y uretra
 - Diversos órganos
 - SNC
 - Sangre (parásitos hemotisulares)
- Algunos pueden permanecer latentes después de la primoinfección
- Frecuentes las enfermedades zoonóticas

Protozoos parásitos

- Características epidemiológicas de los protozoos parásitos:
 - ✓ Alta excreción de ooquistes/quistes/esporas al ambiente
 - ✓ Dosis infectiva baja
 - ✓ Baja respuesta inmunitaria
 - ✓ Estabilidad en el ambiente (Mayor estabilidad a temperaturas moderadas)
 - ✓ Alta presencia en animales
 - ✓ Alta presencia en aguas ambientales
 - ✓ Resistentes a la desinfección:
 - Cloro poca efectividad
 - Ozono mayor efectividad
 - U.V
 - Mejor opción: Filtración (previa floculación-coagulación)

Protozoos parásitos

- Tratamiento:
 - Eliminación de partículas:
 - ✓ Coagulación, sedimentación, filtración
 - ✓ Combinación coagulación con filtración (99-99,99%)
 - ✓ Presencia en agua de retrolavado de filtros
 - Desinfección:
 - ✓ Quistes/ooquistes resistentes al cloro y similares
 - ✓ Ozono y Dióxido de cloro efectivos
 - No existe buena correlación con indicadores fecales

	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Protozoos	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-1 log ₁₀	0-3 log ₁₀	1-4 log ₁₀

Cryptosporidium spp.

- Coccidios infectan microvellosidades
 - Tracto digestivo
 - Tracto respiratorio
- Existen 22 especies descritas
 - *C. parvum*: mamíferos, hombre (inmunodeprimido y competentes)
 - Genotipo ciervo, ratón,.....
 - *C. hominis*: hombre (inmunodeprimido y competentes)
 - *C. meleagridis*: aves, hombre (inmunodeprimidos)
 - *C. felis*: gatos, hombre (inmunodeprimidos)



4-6 μ m

Dos tipos:

Pared gruesa

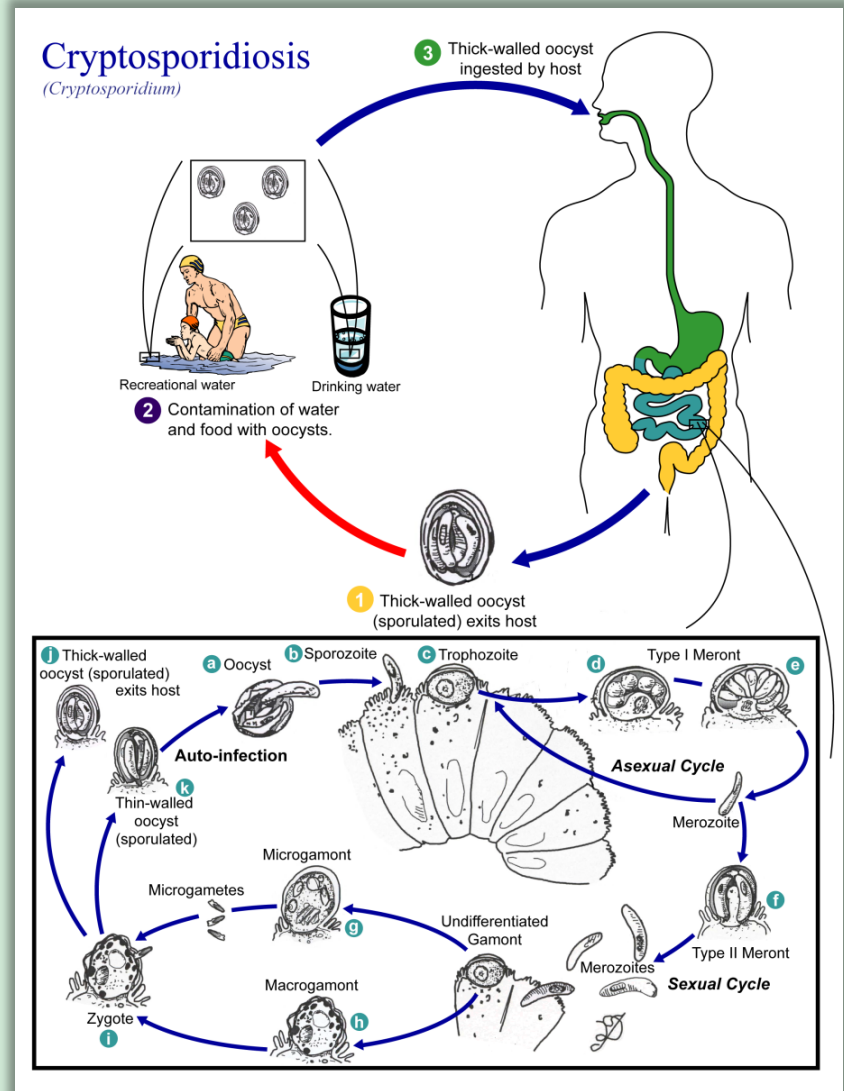
Pared delgada



Cryptosporidium spp.

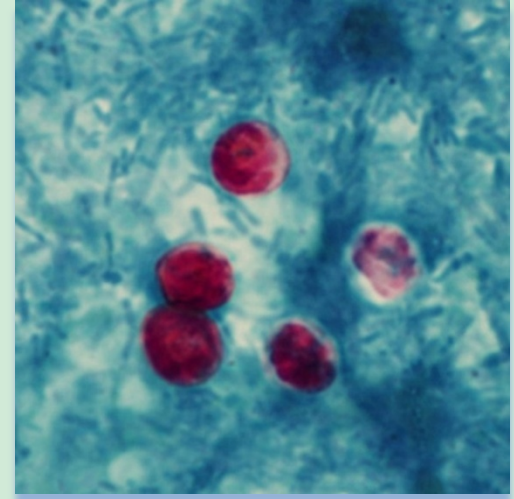
- Características biológicas para la transmisión hídrica

- Gran excreción de ooquistes por el hospedador infectado
- Especificidad baja (muchos reservorios)
- Ooquistes muy robustos
 - Viables más de 6 meses
 - Resistentes a los desinfectantes
- Pequeño tamaño
- Baja dosis infectiva ID: 132 (30)



Cryptosporidium spp.

- Probabilidad de infección:
 - 0,5% con 1 ooquiste
 - 20% con 30 ooquistes
 - 100% con 1000 ooquistes
- Periodo medio de incubación: 7 días
- Síntomas principales:
 - Diarrea acuosa abundante con deshidratación y pérdida de peso
 - Náuseas, calambres abdominales, vómitos y fiebre
 - Inmunocompetentes (IMC): Infección autolimitada
 - Inmunodeprimidos (IMD): Infecciones persistentes



Cryptosporidium spp.

- Prevalencia

- Europa: 1-4%
- África, Asia, Australia, Sudamérica: 3-20%
- Aumentos durante primavera y otoño en países desarrollados
- Portadores asintomáticos
 - <1% en países desarrollados
 - Porcentajes altos en guarderías
 - 10-30% en países en desarrollo
- Seroprevalencia alta: (mayor que para estudios coprológicos)
 - 25-35% en países desarrollados
 - 95% en países en desarrollo
 - Incremento con la edad

Cryptosporidium spp.

- Rutas de transmisión (dificultad para establecer el origen de los brotes)
 - Transmisión oral-fecal
 - Brotes alimentarios:
 - Consumo de vegetales regados
 - Leche contaminada
 - Sidra (CDC, 1997)
- Patógeno emergente de transmisión hídrica
- Numerosos brotes:
 - Todo tipo de aguas
 - Contaminación por heces animales y humanas
 - Contaminación en la elaboración de aguas
 - 1984-1997: 21 brotes bien documentados (EEUU, Uk, Japón): 443.000



Cryptosporidium spp.

- Milwaukee: 400.000 afectados
 - 53 millones \$: pérdida de productividad, baja laborales, facturas médicas
 - 100 millones \$: demandas por muerte

Vol. 331 No. 3

CRYPTOSPORIDIUM INFECTION FROM MILWAUKEE'S PUBLIC WATER SUPPLY

A MASSIVE OUTBREAK IN MILWAUKEE OF CRYPTOSPORIDIUM INFECTION TRANSMITTED THROUGH THE PUBLIC WATER SUPPLY

WILLIAM R. MAC KENZIE, M.D., NEIL J. HOXIE, M.S., MARY E. PROCTOR, PH.D., M.P.H.,
M. STEPHEN GRADUS, PH.D., KATHLEEN A. BLAIR, M.S., R.N., DAN E. PETERSON, M.D., M.P.H.,
JAMES J. KAZMIERCZAK, D.V.M., DAVID G. ADDISS, M.D., M.P.H., KIM R. FOX, P.E.,
JOAN B. ROSE, PH.D., AND JEFFREY P. DAVIS, M.D.

- Las Vegas: 78 afectados (61 HIV: la mayoría murieron)
- Japón (1996): 8.705 afectados (63% población de la ciudad)

Cryptosporidium spp.

ANN IST SUPER SANITÀ 2012 | VOL. 48, No. 4: 429-446
DOI: 10.4415/ANN_12_04_10

Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis

Rachel M. Chalmers

Cryptosporidium Reference Unit, Public Health Wales, Singleton Hospital, Swansea, UK

Table 1 | *Cryptosporidium* species and selected genotypes and their association or not with human cryptosporidiosis

<i>Cryptosporidium</i> species	Mean oocyst dimensions (µm)	Major host(s)	Association with human cryptosporidiosis or infection	Selected references
Most commonly associated with human cryptosporidiosis				
<i>C. hominis</i>	4.9 x 5.2	Humans	Common in sporadic cases and outbreaks; infectivity data from experimental infections in adults	[2]
<i>C. parvum</i>	5.0 x 4.5	Humans, ruminants	Common in sporadic cases and outbreaks; infectivity and dose response data from experimental infections in adults	[1]
<i>C. meleagridis</i>	5.2 x 4.6	Homoeothermic birds; mammals including humans	Sporadic cases reported, more frequent in some populations, for example as common as <i>C. parvum</i> in Peru and Thailand; infectivity data from experimental infections in adults	[3, 6]
Less commonly associated with human cryptosporidiosis				
<i>C. canis</i>	5.0 x 4.7	Dog	Epidemiologically linked to diarrhea in children in a shanty town in Lima, Peru; occasional sporadic cases in various countries, especially developing countries	[5, 6]
<i>C. cuniculus</i>	5.6 x 5.4	Rabbit, humans	Caused a waterborne outbreak in UK; occasional and seasonal sporadic cases in UK, individual reports from France, children in Nigeria	[4]
<i>C. felis</i>	4.6 x 4.0	Cat	Epidemiologically linked to diarrhea in children in a shanty town in Lima, Peru; occasional sporadic cases in various countries	[5, 6]
<i>C. ubiquitum</i>	5.0 x 4.7	Various mammals	Sporadic cases in various countries, especially developed countries	[6]
<i>C. viatorum</i>	5.4 x 4.7	Humans	Sporadic cases emerging in UK and Sweden, linked to visits to the Indian sub-continent, South America and Africa	[7]

Cryptosporidium spp.

Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 101, No. 6, 539-545 (2007)

SHORT COMMUNICATION

Cryptosporidium in patients with diarrhoea, on Tenerife, Canary Islands, Spain

TABLE 1. Details of the 10 positive samples from the 185 patients with diarrhoea

Patient:				Results of:		Isolate	
Age (years)	Gender	Immunological status	Initial diagnosis	PCR	Microscopy	Designation	Species
8	Male	Immuno-compromised	Cryptosporidiosis	+	+	ROMT	<i>Cryptosporidium parvum</i>
75	Male	Immuno-competent	None	+	-	3229T	<i>Cr. parvum</i>
30	Male	Immuno-competent	None	+	-	3734T	<i>Cr. parvum</i>
1	Female	Immuno-competent	Cryptosporidiosis	+	+	4114T	<i>Cr. hominis</i>
86	Male	Immuno-competent	None	+	-	5065T	<i>Cr. parvum</i>
26	Male	Immuno-compromised	None	+	+	5840T	<i>Cr. parvum</i>
12	Female	Immuno-competent	None	+	-	6831T	<i>Cr. parvum</i>
30	Male	Immuno-competent	None	+	-	7298T	<i>Cr. parvum</i>
4	Male	Immuno-competent	<i>Campylobacter jejuni</i>	+	-	7398T	<i>Cr. parvum</i>
46	Male	Immuno-competent	None	+	-	7803T	<i>Cr. parvum</i>

*HIV-positive.

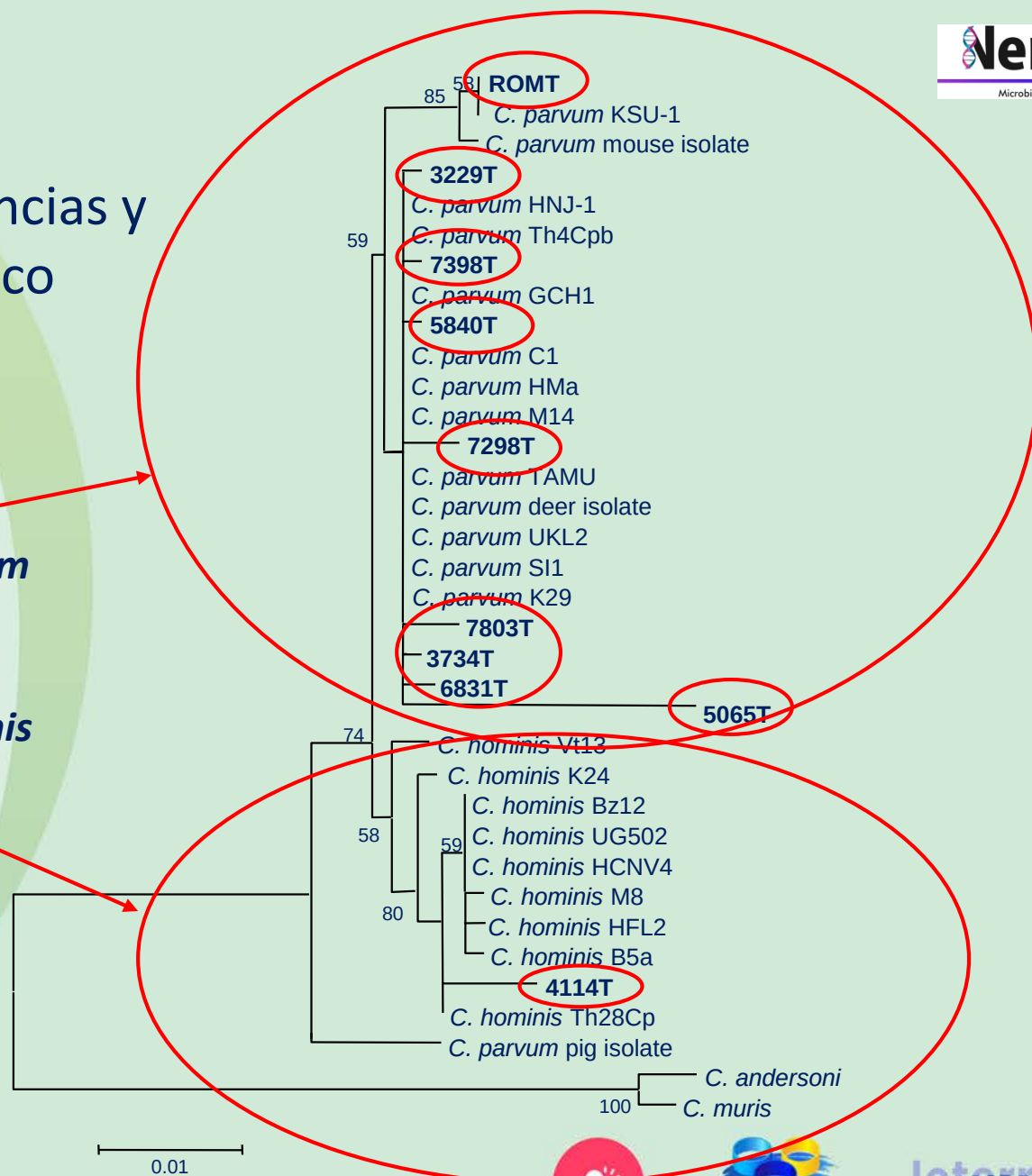
OBJETIVOS:

- Prevalencia de *Cryptosporidium* en pacientes con diarreas
- Especies involucradas
- 174 muestras de inmunocompetentes/11 inmunodeprimidos
- 3 muestras positivas por microscopía (1,6%)
- 10 muestras positivas por PCR (7 negativas por microscopía) (5,4%)
- 2 criptosporidiosis diagnosticadas inicialmente/1 coinfección

Estudio de secuencias y análisis filogenético

Cryptosporidium parvum

Cryptosporidium hominis



Cryptosporidium spp.

- Infección por *Cryptosporidium* infravalorada por microscopía
- Nº alto de adultos infectados :
 - Alto contacto con animales/Agua de consumo contaminada
- *Campylobacter jejuni*, único patógeno aislado
- Prevalencia baja en pacientes VIH
- Poca consideración por parte de los clínicos: adultos inmunocompetentes con diarreas sin otros patógenos
- Problema de salud en todo el mundo
- Primera descripción específica en Canarias
- Distribución de especies similar a Europa
- No se detectaron otras especies descritas en inmunodeprimidos

Cryptosporidium spp.

DOI: 10.2478/s11686-009-0008-4
© 2009 W. Stefański Institute of Parasitology, PAS
Acta Parasitologica, 2009, 54(1), 1–5; ISSN 1230-2821



Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in pigeons (*Columba livia*)

Néstor Abreu-Acosta*, Pilar Foronda-Rodríguez, Mercedes López and Basilio Valladares

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Avda. Astrofísico F. Sánchez, s/n 38203,
La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

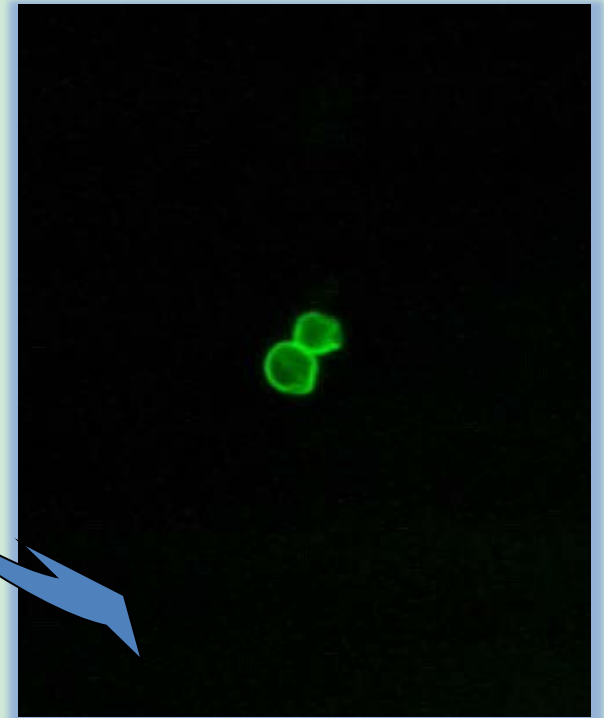


OBJETIVOS

- Presencia de *Cryptosporidium* spp. en *Columbia livia* (Paloma bravía)
- Papel potencial en la transmisión de *Cryptosporidium*

Cryptosporidium sp.

- 2 palomas positivas (5,9%) por tinción
- Muestras de agua residual positivas 100%



Cryptosporidium sp.

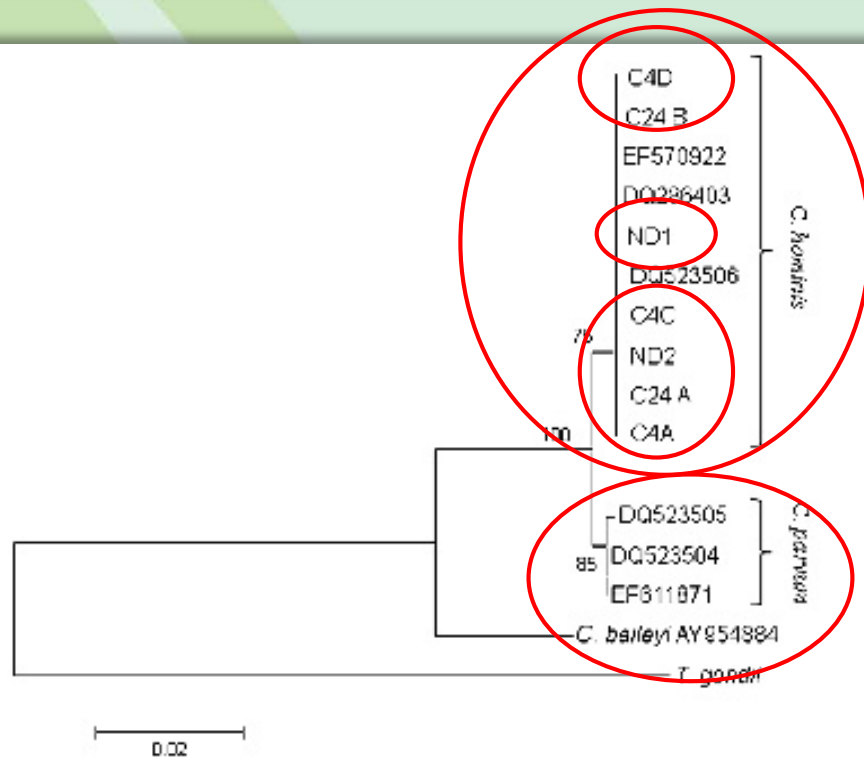


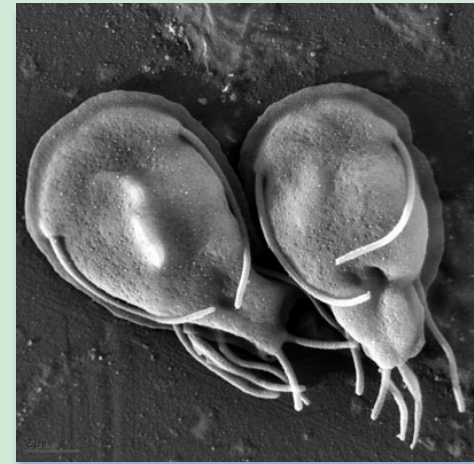
Fig. 1. Phylogenetic tree of neighbour-joining distance generated from SSUrRNA sequence information with the *Cryptosporidium* isolates from pigeons (*Columba livia*) (C4, C24) and wastewater (ND), and with different references of *Cryptosporidium* spp.

- Todos los aislados: *C. hominis*
- Aislados en el clado de *C. hominis*

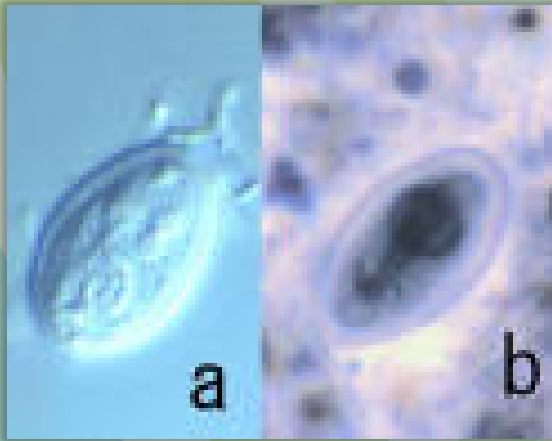
- Primera identificación específica de aislados de *Cryptosporidium* en animales y aguas residuales

Giardia sp.

- Protozoo flagelado
- Taxonomía y especificidad de hospedador debatida
- Parásito clonal
- 6 especies reconocidas
 - *G. lamblia*: mamíferos, roedores, reptiles, aves (posible)
- Varios genotipos
 - Assemblage A: Hombre, gatos, perros, ovejas, vacas, caballos, cerdos, lemures, castores
 - Assemblage B: Casi exclusivo hombre
 - Assemblage C y D: perros
 - Assemblage E (A-livestock): Vacas, ovejas, cabras, alpaca, cerdos
 - Assemblage F: Gatos
 - Assemblage G: Ratas
- Gran variabilidad entre aislados animales y humanos

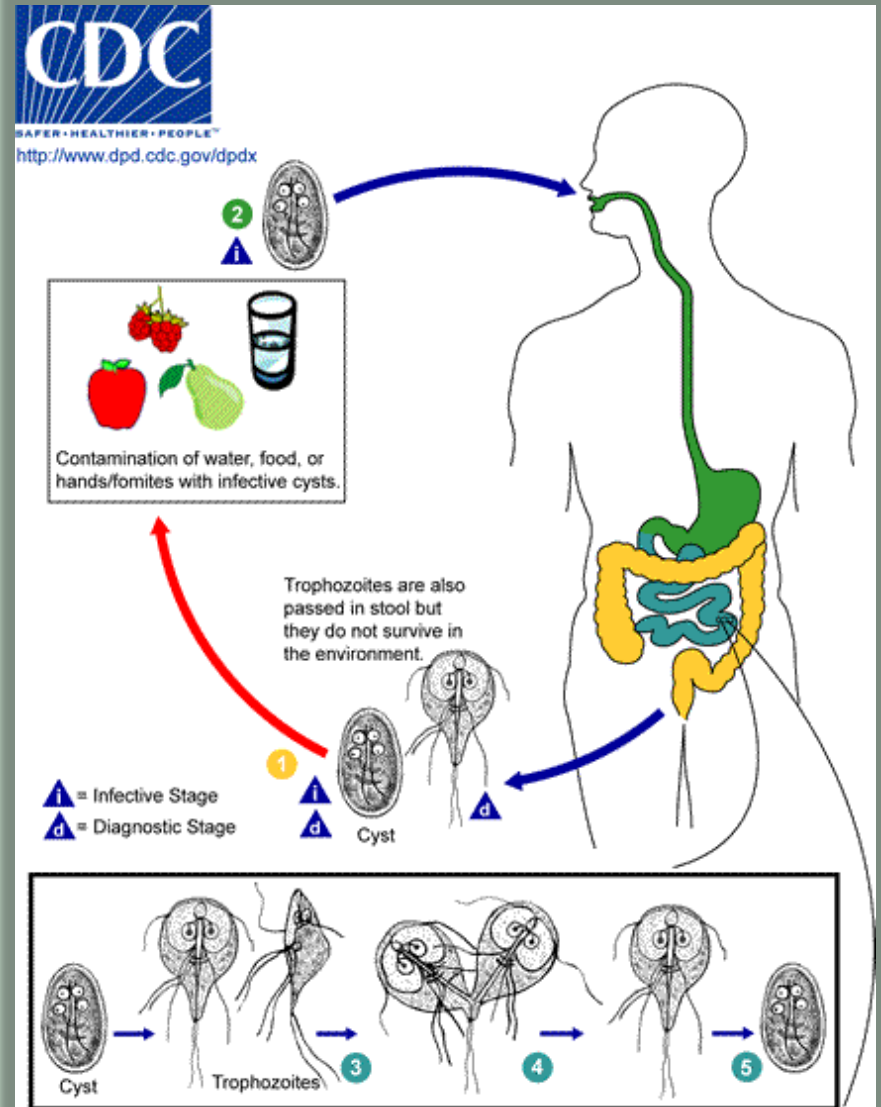


Giardia sp.



8-12 μm x 7-10 μm

Pared: 0,3-0,5 μm



Giardia sp.

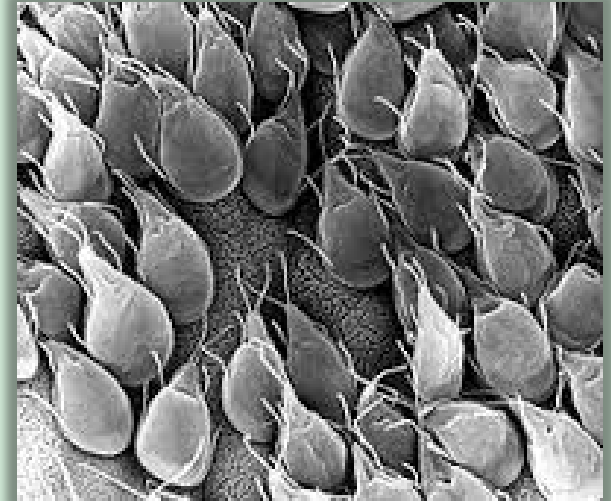
- Síntomas principales:

- Diarreas, debilidad, pérdida de peso
- Dolor abdominal, náuseas, vómitos,
- Flatulencia fiebre

- Muchos casos asintomáticos (16-86%)

- Mecanismo de diarrea y malabsorción incierto

- Barrera física
- No producción de toxinas
- Alteración de actividad enzimática (lactasa, disacaridasa)
- Daño a la superficie mucosa
- Infecciones bacterianas secundarias o levaduras



Giardia sp.

- Periodo entre infección y aparición de quistes: 12-19 días
- Aparición de síntomas: 6-15 días de la infección
- Infección aguda y autolimitada (2-4 semanas)
- 30-50% población infectada: infección crónica (grandes pérdidas de peso)
- ID:25-100 (10)
- Infectividad en función de:
 - Aislado
 - Respuesta del enfermo
 - Estatus nutricional e inmunológico

Giardia sp.

- Rutas de transmisión:

- Principal vía: transferencia fecal-oral

- Alta prevalencia en situaciones higiénicas pobres
 - Escuelas y guarderías
 - Brotes alimentarios: trabajadores contaminados o miembros familiares

- Brotes hídricos:

- USA: patógeno más común en brotes hídricos (+ 100)
 - Brotes: Australia, Canadá, Nueva Zelanda, Suiza, UK
 - Origen: aguas sin tratar contaminadas por aguas residuales
 - Heces humanas, roedores
 - Tratamiento exclusivo por desinfección
 - Filtración inefectiva
 - Cruce de conexiones
 - Daños en sistemas de distribución



Giardia sp.

Identification of a novel assemblage G subgenotype and a zoonotic assemblage B in rodent isolates of *Giardia duodenalis* in the Canary Islands, Spain

ÁNGELA FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ¹, AARÓN MARTÍN-ALONSO¹,
NÉSTOR ABREU-ACOSTA², CARLOS FELIU³, JEAN-PIERRE HUGOT⁴,
BASILIO VALLADARES¹ and PILAR FORONDA^{1*}

¹University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

²Analytical Biotech, Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain

³Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Muséum National d'Histoire naturelle, Paris, France

(Received 15 April 2013; revised 11 June 2013; accepted 18 July 2013)

- Detección de los genotipos G y B
 - B: Humanos y animales
 - G: Animales y en humanos en contacto con animales
- Roedores: función de reservorios naturales

Table 1. Frequency of *Giardia* in rodents in the Canary Islands

Island and host species	Analysed samples (n)	Positive samples (%) [CI 95%]
Tenerife	48	15 (31·3) [20–45·3]
<i>R. rattus</i>	25	9 (36) [20·3–55·5]
<i>R. norvegicus</i>	1	0 (0) [0–79·4]
<i>M. m. domesticus</i>	22	6 (27·3) [13·2–48·2]
La Palma	20	5 (25) [11·2–46·9]
<i>R. rattus</i>	3	2 (66·7) [20·8–93·9]
<i>R. norvegicus</i>	1	1 (100) [20·7–100]
<i>M. m. domesticus</i>	16	2 (12·5) [3·5–36]
La Gomera	32	7 (21·9) [11–38·8]
<i>R. rattus</i>	12	2 (16·7) [4·7–44·8]
<i>M. m. domesticus</i>	20	5 (25) [11·2–46·9]
El Hierro	31	6 (19·4) [9·2–36·3]
<i>R. rattus</i>	14	3 (21·4) [7·6–47·6]
<i>M. m. domesticus</i>	17	3 (17·6) [6·2–41]
Gran Canaria	50	18 (36) [22·7–49·3]
<i>R. rattus</i>	19	11 (57·9) [36·3–76·9]
<i>R. norvegicus</i>	1	1 (100) [20·7–100]
<i>M. m. domesticus</i>	30	6 (20) [9·5–37·3]
Fuerteventura	44	11 (25) [14·6–39·4]
<i>R. rattus</i>	23	8 (34·8) [18·8–55·1]
<i>M. m. domesticus</i>	21	3 (14·3) [5–34·6]
Lanzarote	39	10 (25·6) [14·6–41·1]
<i>R. rattus</i>	20	7 (35) [18·1–56·7]
<i>M. m. domesticus</i>	19	3 (15·8) [5·5–37·6]
La Graciosa	20	1 (5) [0·9–23·6]
<i>R. rattus</i>	–	–
<i>M. m. domesticus</i>	20	1 (5) [0·9–23·6]
Total	284	74 (26·1) [021–31·2]
<i>R. rattus</i>	116	42 (36·2) [30·6–41·8]
<i>R. norvegicus</i>	3	2 (66·7) [22·8–95·6]
<i>M. m. domesticus</i>	165	29 (17·6) [11·8–23·4]



Cryptosporidium spp./Giardia sp. en AARR

PRESENCIA DE *GIARDIA LAMBLIA*
Y *CRYPTOSPORIDIUM SPP.* EN AGUAS
RESIDUALES DEPURADAS REUTILIZADAS PARA
RIEGO AGRÍCOLA EN LA ISLA DE TENERIFE,
ESPAÑA. EFECTOS DEL TRANSPORTE A LARGA
DISTANCIA SOBRE LA CALIDAD
DEL AGUA REUTILIZADA

GIARDIA LAMBLIA Y CRYPTOSPORIDIUM SPP.
PRESENCE IN TREATED WASTEWATER REUTILISED
FOR IRRIGATION IN TENERIFE ISLAND, SPAIN. LONG-
DISTANCE TRANSPORT EFFECTS IN THE REUTILISED
WATER QUALITY

N. Abreu Acosta ¹, Macrina Martín Delgado ², Antonio Ortega Rivas ¹, Antonio del Castillo Remiro ¹, Escolástico Aguilar González ³ y Basilio Valladares Hernández ¹

¹ Departamento de Parasitología, Ecología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna.

² Servicio de Sanidad Ambiental. Dirección General de Salud Pública. Servicio Canario de la Salud.

³ Organismo Autónomo de Balsas de Tenerife. Consejo Insular de Aguas de Tenerife. Cabildo Insular de Tenerife.



- OBJETIVOS
- Presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium*
- Evolución a través del sistema
- Relación con parámetros indicadores

Cryptosporidium spp./*Giardia* sp. en AARR



- 96 muestras de 6 puntos
- Aislamiento y cuantificación de protozoos
 - Floculación inorgánica
 - IFD
- Determinación y cuantificación de indicadores fecales (Cf, Sf, Csr)
- Parámetros físico-químicos (DBO_5 , MES)

Cryptosporidium spp./*Giardia* sp. en AARR

- Presencia de *Giardia*: 34,9%
- Mayor frecuencia en los primeros puntos
- Número de quistes en pto 1 y 2 superior al resto
- Correlaciones con Sf, Csr, DBO₅ y MES



Tabla 1: Rango, media y desviación típica (quistes/litro) y frecuencia (%) de quistes de *Giardia lamblia* en las muestras analizadas por punto de muestreo y global.

Punto de muestreo	Rango (quistes/l)	Media $\pm$ desv.típ.	% presencia
Punto 1	0 - 29	7 $\pm$ 10	71.4
Punto 2	0 - 22	5 $\pm$ 7	69.2
Punto 3	0 - 30	6 $\pm$ 11	28.6
Punto 4	0 - 27	2 $\pm$ 7	7.14
Punto 5	0 - 23	3 $\pm$ 7	21.4
Punto 6	0 - 2	0 $\pm$ 0	14.3
Global	0 - 30	4 $\pm$ 8	34.9

Cryptosporidium spp./*Giardia* sp. en AARR

- Presencia de *Cryptosporidium*: 9,64%
- Número de quistes similares entre los puntos
- No presentó correlaciones con ningún parámetro

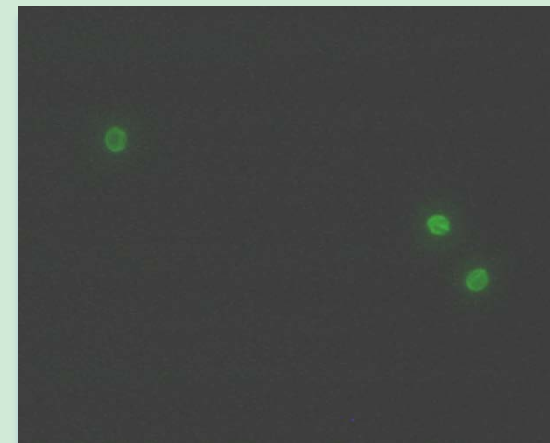


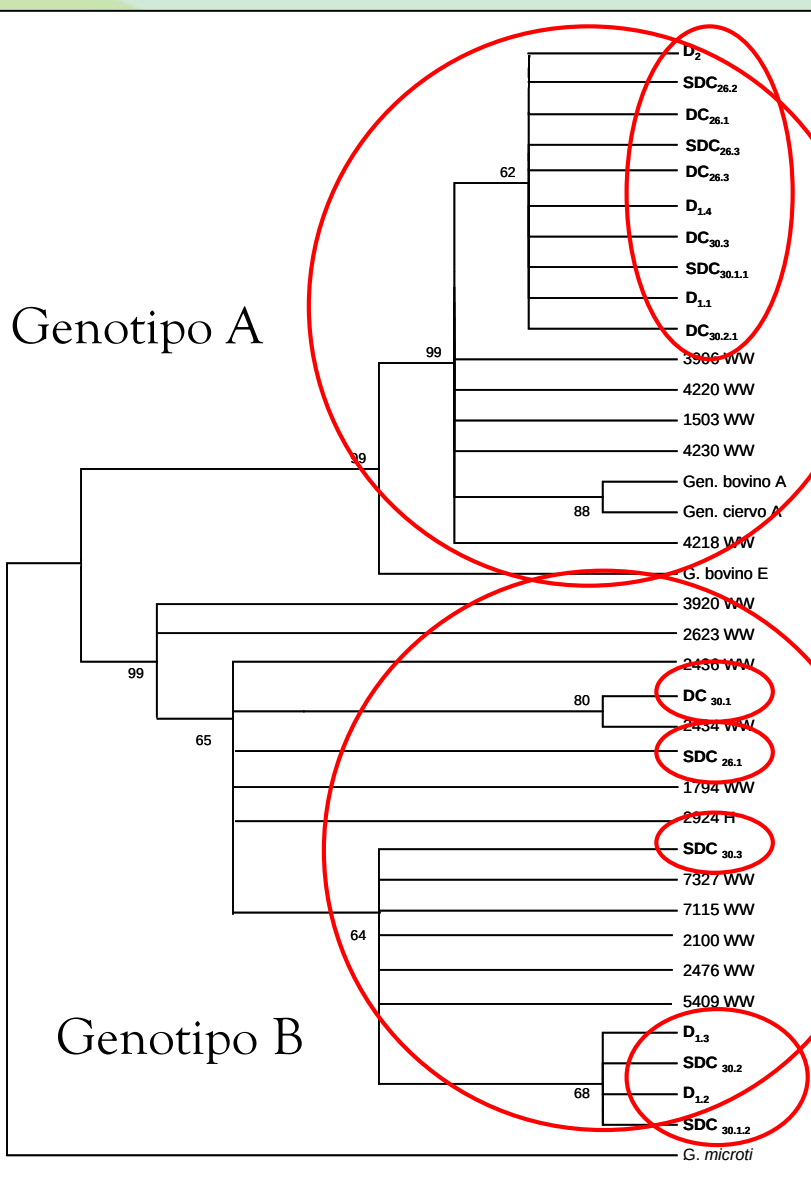
Tabla 2: Rango, media y desviación típica (ooquistes/litro) y frecuencia (%) de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras analizadas por punto de muestreo y global.

Punto de muestreo	Rango (quistes/l)	Media $\pm$ desv.típ.	% presencia
Punto 1	0 - 2	0 $\pm$ 0	21.4
Punto 2	0 - 1	0 $\pm$ 0	15.4
Punto 3	0 - 0	0 $\pm$ 0	0
Punto 4	0 - 1	0 $\pm$ 0	7.14
Punto 5	0 - 1	0 $\pm$ 0	14.3
Punto 6	0 - 0	0 $\pm$ 0	0
Global	0 - 2	0 $\pm$ 0	9.64

Cryptosporidium spp./*Giardia* sp. en AARR

- *Giardia* sp.
 - El tratamiento avanzado, y transporte produce reducción
 - Correlaciones bajas con indicadores fecales
 - Correlación con MES por ser materia particulada
- *Cryptosporidium* sp.
 - Presentes en todos los puntos menos en la distribución
 - Reducción no apreciables
 - Correlaciones bajas con indicadores fecales
- Contenidos bajos por el tipo de muestra y la sensibilidad de la técnica

Genotipo A



Genotipo B

Especies y genotipos de *Giardia* sp.

- Estudio de homologías: *G. duodenalis*
- 17 haplotipos no publicados (58,8% A; 41,2% B)
- Mezcla de genotipos
- Aporte humano de *Giardia duodenalis*
- Prevalencia similar para Genotipos A y B

Giardia sp. en AARR

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

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

Cryptosporidium sp en AARR

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

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

Cryptosporidium spp./Giardia sp.

DOI: 10.2478/s11686-012-0016-7

© W. Stefański Institute of Parasitology, PAS

Acta Parasitologica, 2012, 57(2), 171–178; ISSN 1230-2821



Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach

Carlos Feliu^{1,2*}, Mercedes López³, María S. Gómez¹, Jordi Torres^{1,2}, Santiago Sánchez¹, Jordi Miquel^{1,2}, Néstor Abreu-Acosta⁴, Juan M. Segovia¹, Aarón Martín-Alonso², Isabel Montoliu¹, Mercedes Villa¹, Ángela Fernández-Álvarez³, Abdoulaye J.S. Bakhoun^{1,2}, Basilio Valladares³, Jorge Orós⁵ and Pilar Foronda³

¹Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028 Barcelona, Spain;

²Institut de Recerca de la Biodiversitat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico F. Sánchez s/n, 38203, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain; ⁴Infulab S.L., Mencey Romen 7, 38530, Candelaria, Tenerife, Spain; ⁵Department of Histology and Pathology, Veterinary Faculty ULPGC, Trasmontaña, s/n, 35416, Arucas (Las Palmas), Canary Islands, Spain;

Table I. Infection site, prevalence (P), mean intensity (MI) and the variance (Var)/mean ratio (MR) of protozoans, helminths and ectoparasites of *Mus musculus domesticus* (n = 173) and *Rattus rattus* (n = 53) from El Hierro, Canary Islands

Parasite group	Parasite species	Infection site	Host taxon					
			<i>Mus musculus domesticus</i>			<i>Rattus rattus</i>		
			P (%)	MI (CI 95%)	Var/MR	P (%)	MI (CI 95%)	Var/MR
Protozoa	<i>Giardia muris</i>	Intestine	12.5 (n = 16)			21.4 (n = 14)		
	<i>Eimeria</i> sp.	Intestine	69.2 (n = 26)			63.6 (n = 11)		
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Intestine	38.5 (n = 26)			77.8 (n = 9)		

Cryptosporidium spp./Giardia sp.

Ecological Engineering 37 (2011) 496–503



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Engineering

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



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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2010

Received in revised form 7 December 2010

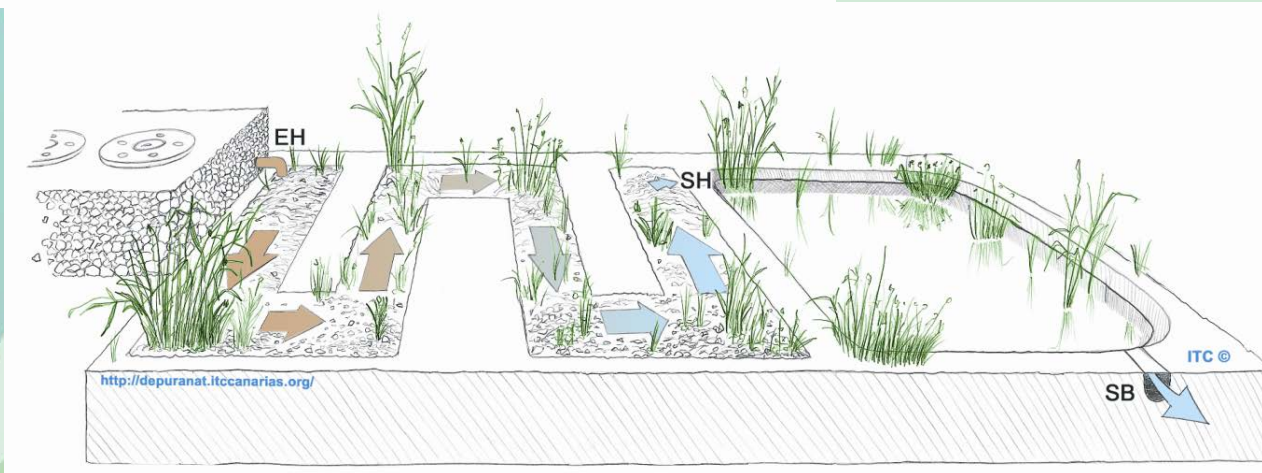
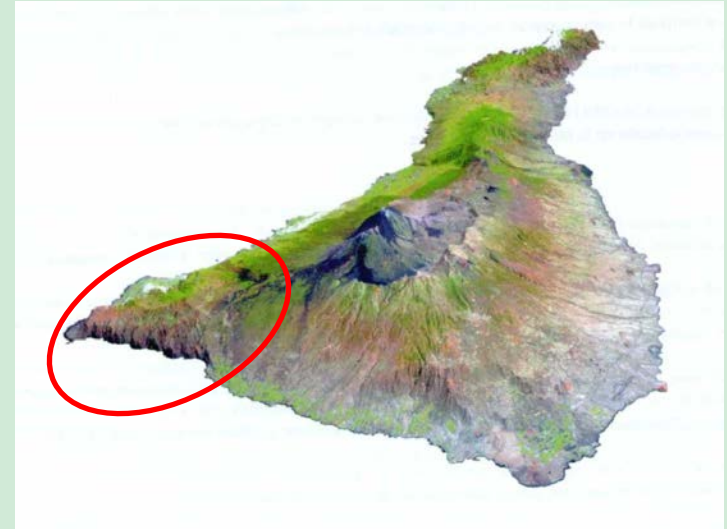
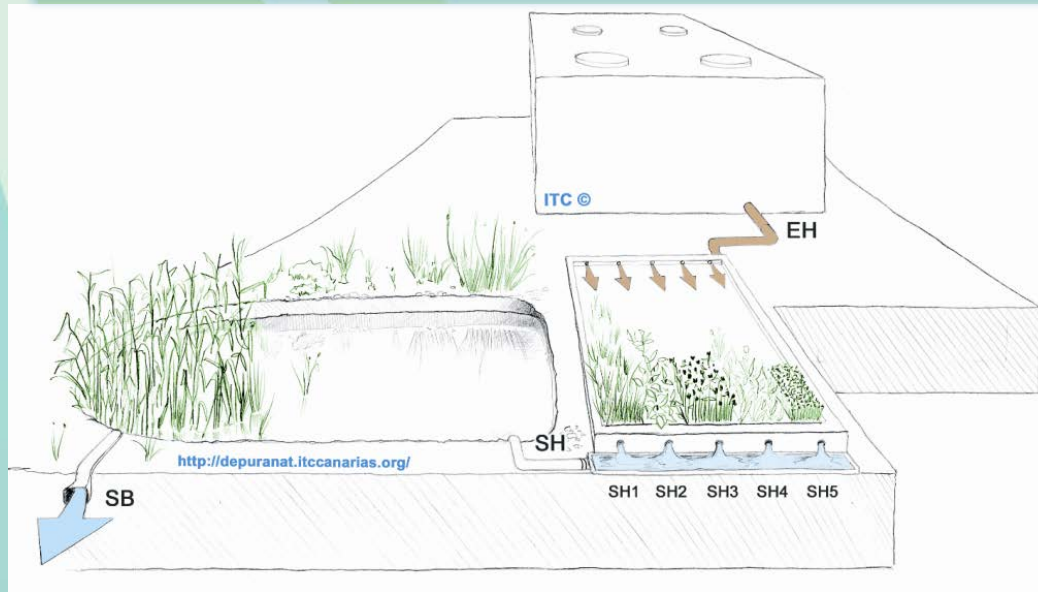
Accepted 12 December 2010

Available online 12 January 2011

ABSTRACT

Two wastewater natural reclamation systems (WWNRS) have been compared regarding their efficiencies on faecal bacteria removal and the persistence of enteric pathogens. These WWNRS are constituted of a combination of anaerobic treatment, small sub-surface flow constructed wetland refilled of volcanic ashes and a final pond as water reservoir. Faecal coliforms, enterococci, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*,

Cryptosporidium spp./*Giardia* sp.



ADAPTRES



Cryptosporidium spp./Giardia sp.

Table 1

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

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

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.

Table 2

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

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

^a Colony forming units per 100 ml of sample.

^b In brackets the percentage of positive samples.

Table 3

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

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

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

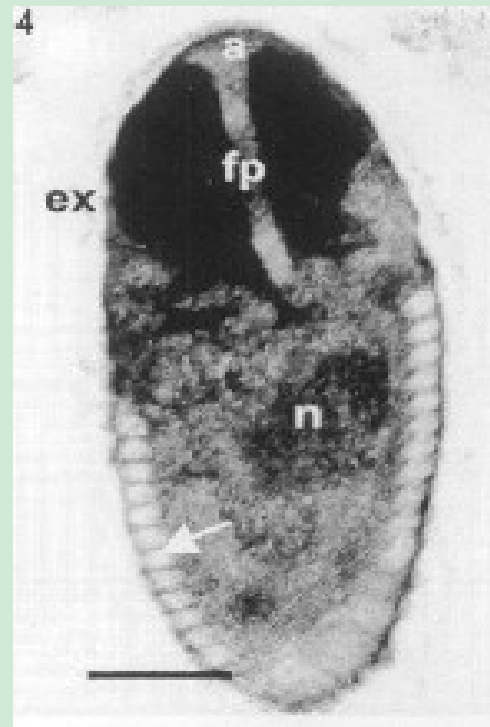
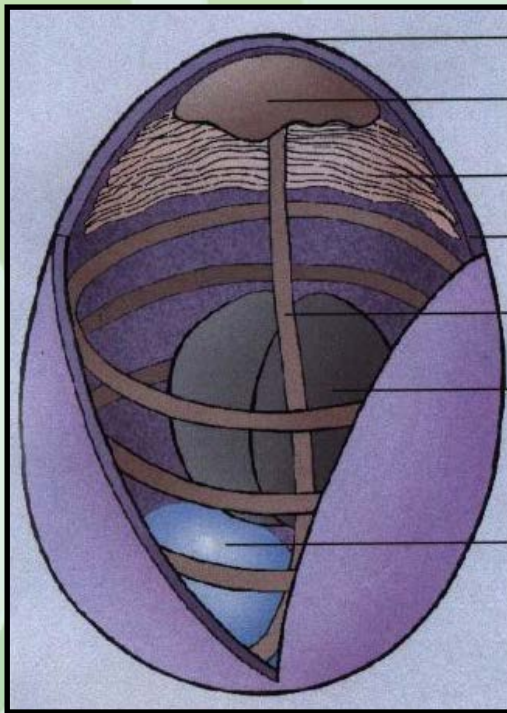
Microsporidios

- Parásitos intracelulares obligados
- Dos tipos de organización: (Fase vegetativa, espora)
 - Fase vegetativa:
 - Membrana con o sin pliegues/engrosamientos
 - Uno o dos núcleos
 - Englobados o no en una vacuola parasítófora
 - Citoplasma con orgánulos característicos
 - Carecen de mitocondrias, peroxisomas y un ap. Golgi primitivo
 - Núcleo único o gemelos

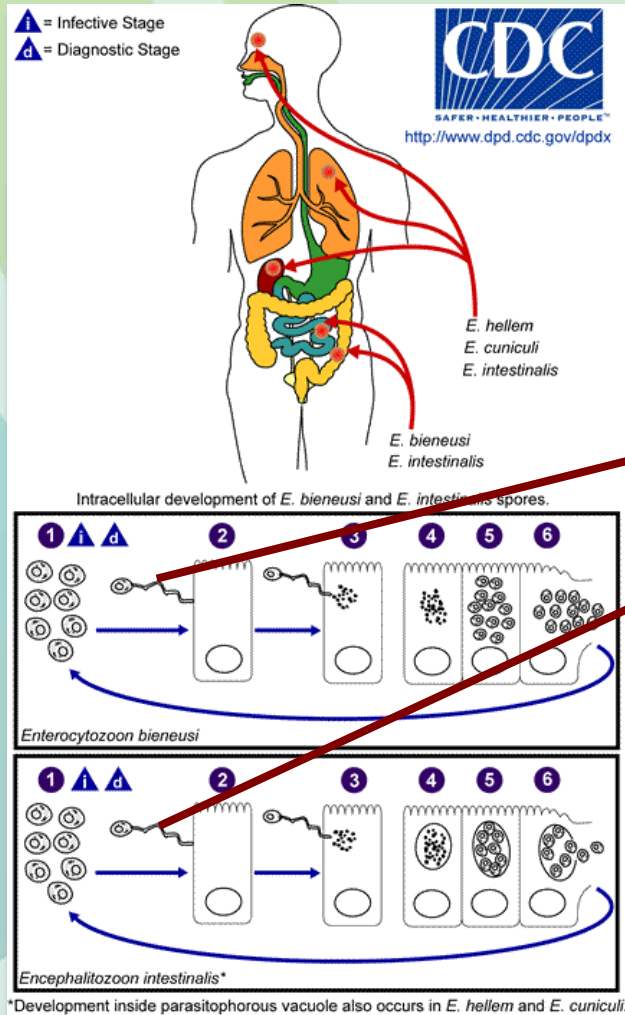
Microsporidios

Espora

- Espora: estrutura ovalada: 1,2 x 0,8 y 20 x 6 μm



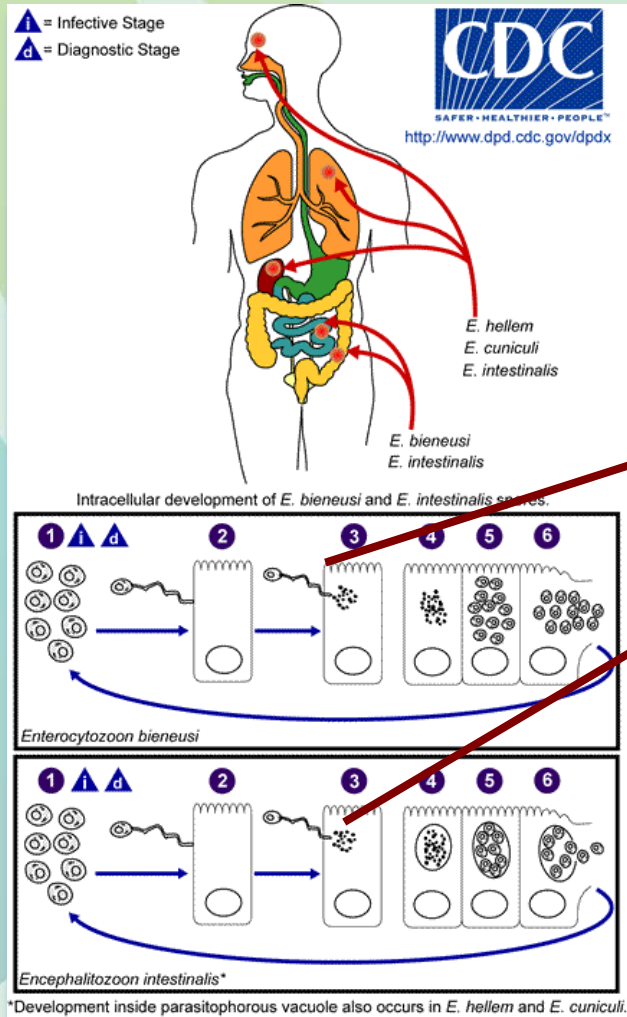
Microsporidiosis



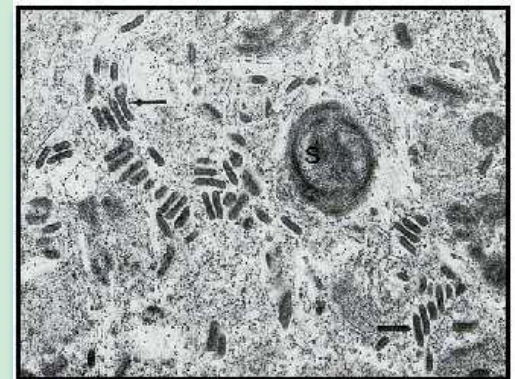
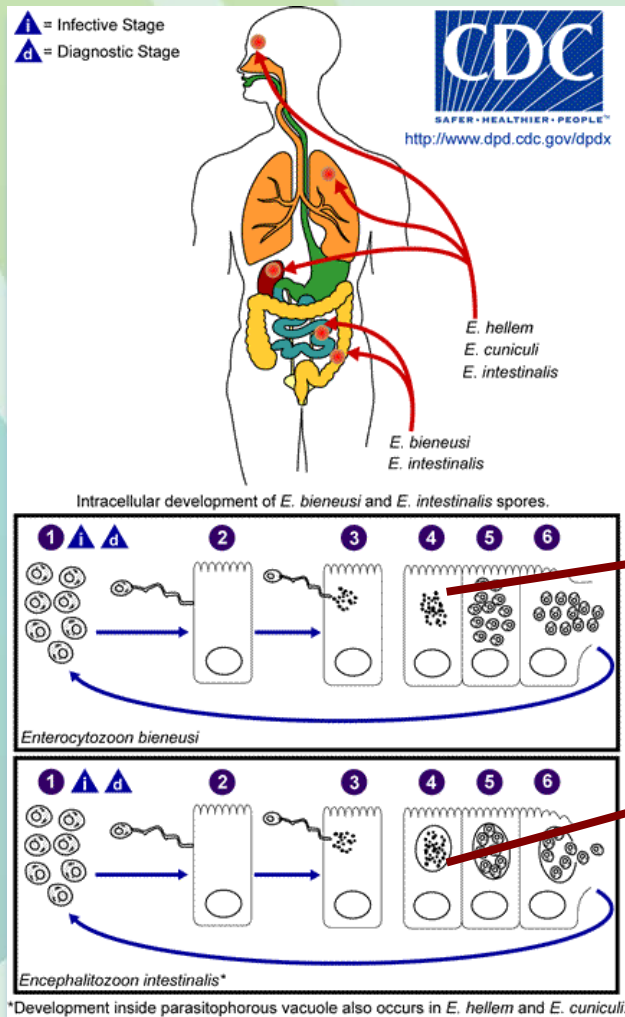
ADAPTRES



Microsporidios



Microsporidios



ADAPTRES

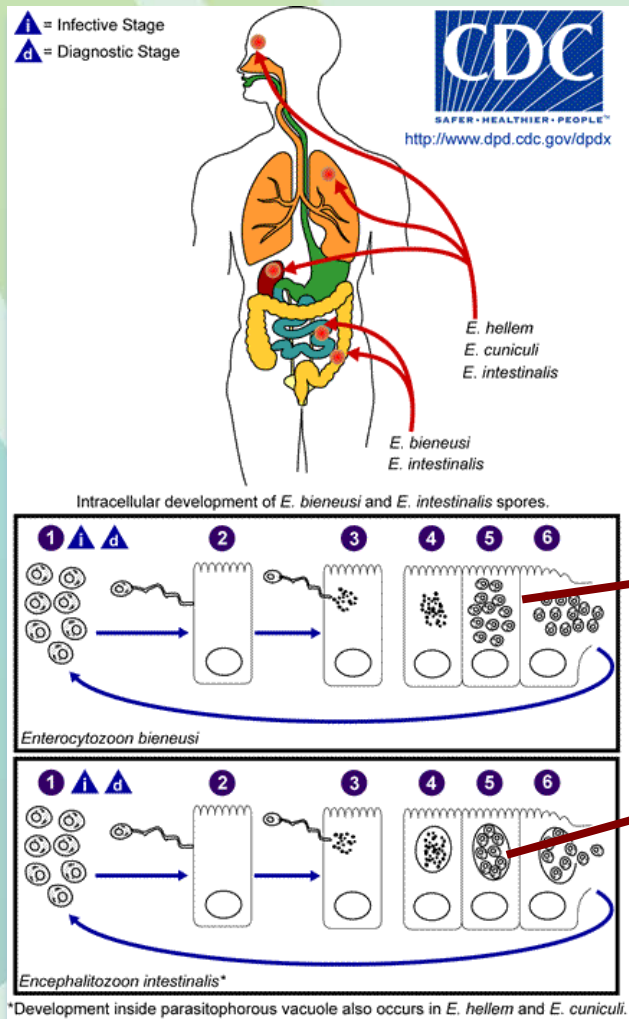


MAC 2014-2020
Cooperação Territorial

Interreg
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



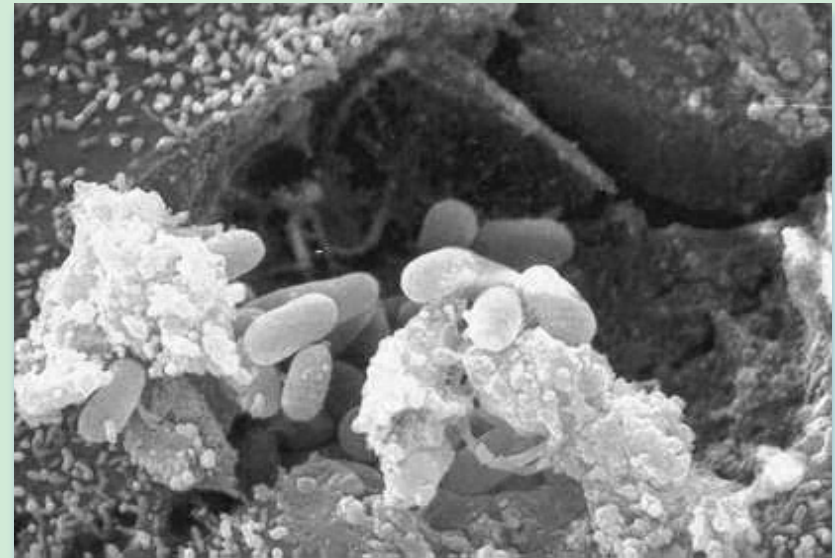
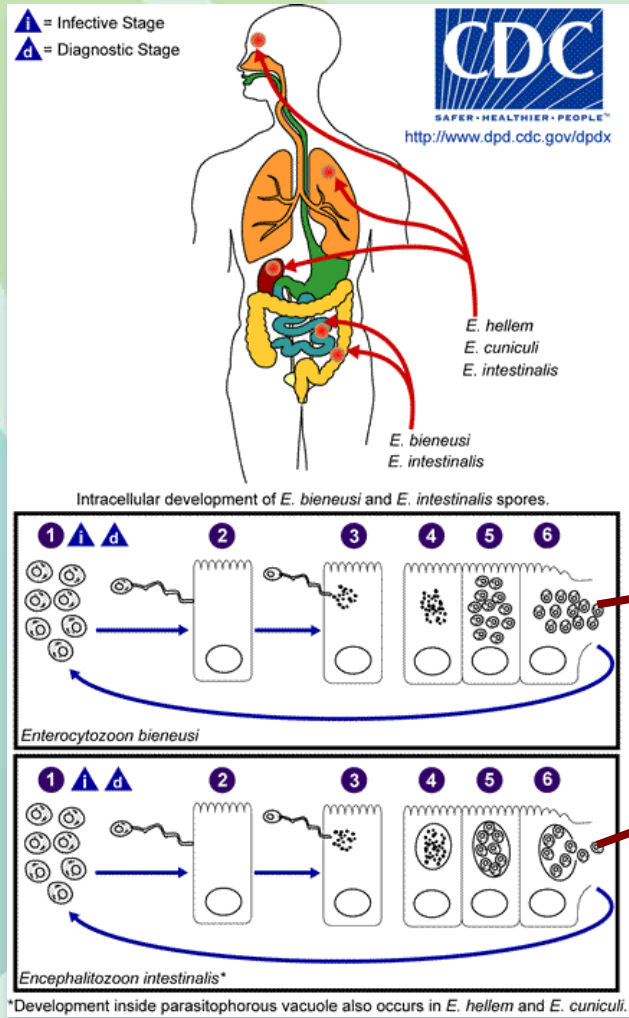
Microsporidios



ADAPTRES



Microsporidios



Microsporidios

Variabilidad intra e interespecífica

- 1200 especies conocidas
- Pocas especies parásitas de mamíferos
- Especificidad de hospedador
- *Encephalitozoon cuniculi*
 - Primer microsporidio en mamíferos
 - Tres cepas (tipo I/conejo, tipo II/ratón, tipo III/perro)
 - Infecciones humana por cepa tipo I y tipo III
 - Marcado carácter zoonótico

Microsporidios

Variabilidad intra e interespecífica

–*Encephalitozoon intestinalis*

- Segunda especie en importancia para el hombre
- Exclusiva del hombre
- Sin variabilidad intraespecífica

–*Encephalitozoon hellem*

- Similitud morfológica con *E. cuniculi*
- Diferenciación por pruebas bioquímicas, inmunológicas o moleculares
- Clara variabilidad intraespecífica: genotipos 1, 2, 3

Microsporidios

Variabilidad intra e interespecífica

– *Enterocytozoon bienersi*

- Única especie del género
- Especie más común en humanos
- Numerosos hospedadores animales
- Variaciones intraespecíficas en aislados humanos
- 49 genotipos descritos en animales y humanos
- Gran diversidad genética y posible papel zoonótico

Microsporidios

Organismo	Cepas/Genotipos	Inmuno-comprometidos	Inmuno-competentes	Otros hospedadores	Vías de transmisión
<i>E. bienensii</i>	Genotipos A,B,C; Tipos I, II, III, IV; Genotipos Ebpa, Ebpb, Ebpc, Ebpd; no clasificado	Diarreas crónica, colecistitis, sinusitis, pneumonía.	Diarrea autolimitada, del viajero, infecciones asintomáticas	Cerdos, perros y primates, gatos	Fecal-oral, transmisión hídrica (Zoonosis)
<i>E. intestinalis</i> (<i>Septata intestinalis</i>)		Diarrea crónica, colangiopatía, sinusitis, bronquitis, neumonía, nefritis, lesiones cutáneas. Diseminación	Diarrea autolimitada, infecciones asintomáticas	Cerdos, perros, vacas, burros, cabras	Fecal-oral, transmisión hídrica (Zoonosis)
<i>E. cuniculi</i>	Cepa I (Cariotipos A, B, C) Cepa II (Cariotipo F) Cepa III (Cariotipo D, E)	Keratoconjuntivitis, sinusitis, bronquitis, pneumonía, nefritis, hepatitis, peritonitis, infecciones intestinales, encefalitis, infección respiratoria asintomática	No identificada ni descrita	Roedores, perros, zorros	Fecal-oral (Zoonosis)
<i>E. hellem</i>	Genotipo I, II, III, desconocido	Keratoconjuntivitis, sinusitis, bronquitis, pneumonía, nefritis, ureteritis, cistitis, prostatitis, infección respiratoria asintomática	No identificada ni descrita	Paseriformes y psitácidos	Fecal-oral, (Zoonosis)

Microsporidios

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (2005) 99, 848–855



www.elsevier.com/locate/jrstm

Enterocytozoon bienewisi (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain

Néstor Abreu-Acosta^a, Jacob Lorenzo-Morales^a, Yaiza Leal-Guio^a, Nieves Coronado-Álvarez^a, Pilar Foronda^a, Julia Alcoba-Florez^b, Fernando Izquierdo^c, Ninive Batista-Díaz^b, Carmen Del Águila^c, Basilio Valladares^{a,*}

^a Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N 38203, La Laguna, Canary Islands, Spain

^b Microbiology Unit, Hospital Nuestra Señora de La Candelaria, Ctra. Del Rosario, S/N 38010, Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain

^c Laboratory of Parasitology, Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Monte Príncipe, Boadilla del Monte, 28668 Madrid, Spain

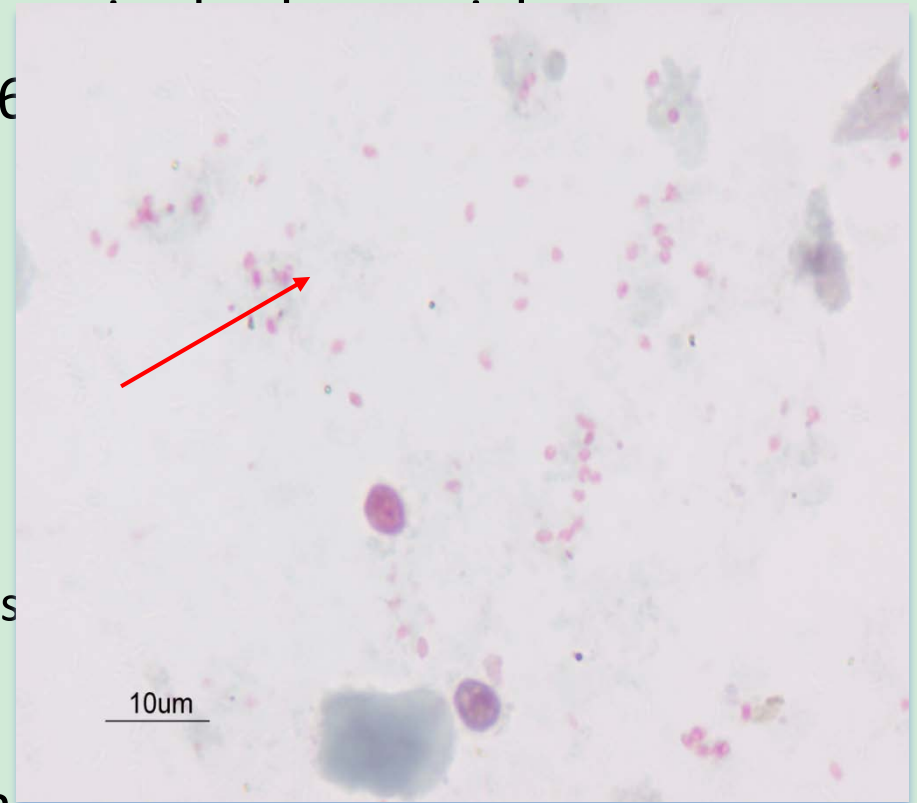
Received 12 April 2005; received in revised form 27 May 2005; accepted 27 May 2005
Available online 18 August 2005

OBJETIVOS:

1. Presencia de *E. bienewisi* en pacientes inmunocompetentes
2. Desarrollo de una sonda para la identificación específica

Microsporidios

- Muestras:
 - 40 orinas
 - 37 esputos
 - 5 lavados bronquiales
 - Estatus inmunológico
 - Test VIH
 - Nivel de leucocitos
 - Identificación de:
 - Parásitos
 - Bacterias
 - Rotavirus, adenovirus y astrovirus
 - Tinción tricrómica modificada
 - Muestras conservadas hasta la extracción ADN (PCR)
- 156 heces
- 9
- 26



Microsporidios

- 273 individuos inmunocompetentes
 - Características morfológicas de *E. bienersi*
 - Heces: 6 (3,85%) Orina: 1 (2,5%) Esputos: 1 (2,70%)
 - PCR
 - Heces: 18 (11,54%) Orina: 1 (2,5%) Esputos: 6 (16,22%)

Table 1 Positive samples identified in this study

Isolate	Sample	Age	Sex	Symptoms	Microscopy	PCR	Hybridisation	Diagnosis
5091	Stool	NA	F	Diarrhoea	—	+	+	ND
5260	Stool	18	F	Diarrhoea	—	+	+	ND
5440	Stool	43	M	Diarrhoea	—	+	+	ND
5444	Stool	73	F	Diarrhoea	—	+	+	ND
5450	Stool	2	M	Ch. Diarrh.	—	+	+	Rotavirus
5585	Stool	40	M	Diarrhoea	—	+	+	ND
5589	Stool	2	M	Diarrhoea	—	+	+	ND
5590	Stool	35	M	Diarrhoea	—	+	+	ND
5697	Sputum	70	M	Resp. Infect.	—	+	+	ND
5851	Stool	73	F	Diarrhoea	+	+	+	ND
6275	Sputum	68	M	Pneumonia	—	+	+	ND
6256	Sputum	83	F	Resp. Infect.	—	+	+	ND
6291	Stool	NA	M	Diarrhoea	—	+	+	ND
6309	Sputum	77	M	Resp. Infect.	—	+	+	ND
6318	Stool	79	M	Diarrhoea	+	+	+	ND
6658	Stool	30	F	Diarrhoea	—	+	+	ND
6827	Stool	NA	M	Diarrhoea	+	+	+	ND
6918	Stool	58	F	Diarrhoea	—	+	+	ND
7242	Stool	7	M	Diarrhoea	—	+	+	ND
7604	Sputum	20	M	Pneumonia	—	+	+	ND
7661	Stool	14	F	Diarrhoea	+	+	+	ND
7885	Sputum	79	M	Pneumonia	+	+	+	ND
8159	Stool	29	M	Diarrhoea	+	+	+	ND
8316	Stool	30	F	Diarrhoea	+	+	+	ND
8358	Urine	50	F	Cystitis	+	+	+	<i>E. coli</i>

NA: Data not available from patient or hospital; Ch. Diarrh.: chronic diarrhoea; Resp. Infect.: respiratory infection; ND: no other pathogen was isolated or identified as the causative agent of clinical symptoms.

• Muestras positivas por M.O positivas por PCR

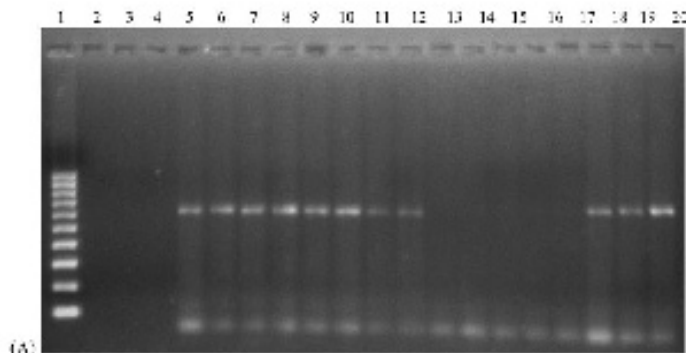
• Mayor nº muestras positivas por PCR

Pacientes con diarreas sin otros patógenos

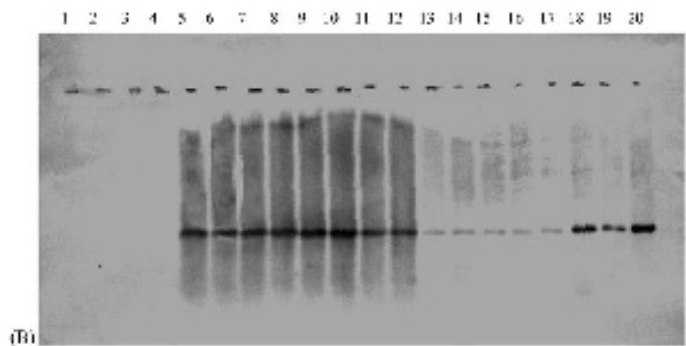
Pacientes con neumonía sin otros patógenos

Paciente con cistitis

Microsporidios



← 607 pb



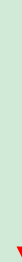
← 607 pb

Figure 1 (A) Amplification of *Enterocytozoon bieneusi* with specific primer pair. Lane 1: 100 bp DNA ladder; lane 2: *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 50261; lane 3: *Encephalitozoon cuniculi* DNA; lane 4: *Cryptosporidium parvum* DNA; lane 5: isolate # 5444; lane 6: isolate # 5450; lane 7: isolate # 5590; lane 8: isolate # 5851; lane 9: isolate # 6256; lane 10: isolate # 6275; lane 11: isolate # 6309; lane 12: isolate # 6318; lane 13: isolate # 6658; lane 14: isolate # 6827; lane 15: isolate # 6918; lane 16: isolate # 7242; lane 17: isolate # 7604; lane 18: isolate # 8159; lane 19: isolate # 8358; lane 20: *Enterocytozoon bieneusi* DNA. (B) Hybridisation of isolates with the specific probe.

Secuenciación

Productos PCR

Sonda



Homología L16868

(*E. bieneusi*)

Microsporidios

- Pocas técnicas diagnósticas para muestras clínicas no fecales
- PCR/hibridación técnica sencilla, no invasiva, específica/sensible para *E. bienersi* ($2,8 \cdot 10^2$ esporas/g ó 16 copias génicas por PCR)
- Epidemiología no ha sido completamente elucidada
- Primera descripción en Canarias
- Presencia poco común en orina y esputos
- Muestras de inmunocompetentes y patógenos únicos
- Incremento de la importancia como patógenos emergentes

Microsporidios

- **Transmisión a través del agua**
 - Características importantes para la transmisión hídrica
 - Brotes hídricos
 - Diseminación por parte de animales
 - *E. bienewisi* genotipo D en aguas depuradas en Tenerife
 - 27,27% en S/C
 - 16,67% en el norte de la Isla
 - Posible vía de transmisión

Microsporidiosis



Molecular Characterization of Human-Pathogenic Microsporidia and *Cyclospora cayentanensis* Isolated from Various Water Sources in Spain: a Year-Long Longitudinal Study

Ana Luz Galván,^{a,b} Angela Magnet,^a Fernando Izquierdo,^a Soledad Fenoy,^a Cristina Rueda,^a Carmen Fernández Vadillo,^a Nuno Henriques-Gil,^c Carmen del Aquila^a

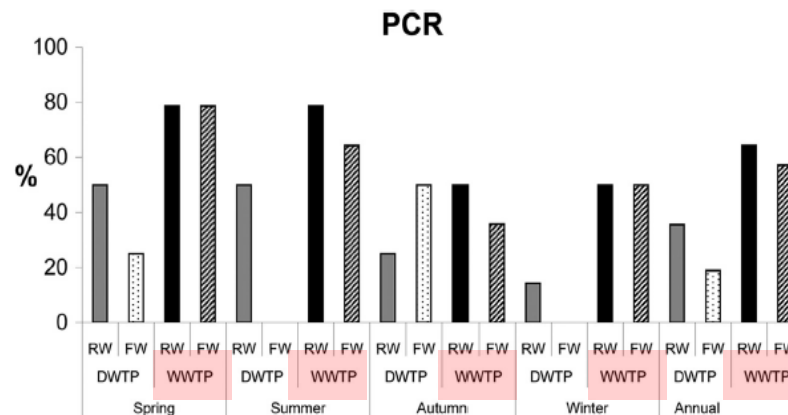


FIG 2 Distribution of results obtained by PCR for microsporidia in raw and finished waters from DWTPs and WWTPs during a year-long longitudinal study. The percentage of positive samples is shown on the y axis. RW, raw water; FW, finished water.

TABLE 1 Prevalence of microsporidia in water samples from different treatment plants and locations of influence during a year-long longitudinal study: comparison between results obtained by a modified trichrome stain and PCR

Sampling point (n) ^a	Prevalence of microsporidia by time period and detection method (no. of positive samples [%]) ^b									
	Spring		Summer		Autumn		Winter ^c		Year	
	MTS	PCR	MTS	PCR	MTS	PCR	MTS	PCR	MTS	PCR
DWTP (16)	3	6	4	4	3	6	2	1	12 (19)	17 (27)
WWTP (28)	7	22	13	20	4	12	3	14	27 (24)	68 (61)
LI (12)	2	8	4	7	4	4	1	5	11 (23)	24 (50)
Total (no. of positive samples/total no. of samples [%])	12/56 (21)	36/56 (64)	21/56 (37)	31/56 (55)	11/56 (20)	22/56 (39)	6/55 (11)	20/55 (36)	50/223 (22)	109/223 (49)

^a n, number of sampling points; DWTP, drinking water treatment plant; WWTP: wastewater treatment plant; LI: location of influence.

^b MTS, modified trichrome stain.

^c One sample from a DWTP in this season could not be obtained.

Técnicas de detección: Protozoos

1.- Fase de concentración:

- Floculación inorgánica
- Filtración

2.- Fase de clarificación(elusión)

- Lavado de los filtros
- Separación por centrifugación en gradiente de concentración
- Inmunoseparación

3.- Detección/cuantificación

- Inmunofluorescencia directa
- PCR/ PCR tiempo real/ LAMP

4.- Estudio de viabilidad (inclusión o no de colorantes vitales: (DAPI, IP)

5.- Diferenciación/genotipado

- Extracción de ADN
- Detección genérica/específica (PCR, PCR tiempo real...)
- Genotipado: genes con resolución interespecífica (PCR)
- Secuenciación
- Estudio de secuencias (BLASTA)

Técnicas de detección: Concentración (Protozoos)



Floculación inorgánica:

- Muestras de 10 l.
- CaCl_2
- NaHCO_3
- pH: 10
- Flóculo disuelto con ác. sulfámico

Journal of
Applied Microbiology



Explore this journal >

A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water

G. Vesey, J.S. Slade, M. Byrne, K. Shepherd, C.R. Fricker ✉

First published: July 1993 Full publication history

DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb03412.x View/save citation

Cited by (CrossRef): 65 articles Check for updates Citation tools



View issue TOC
Volume 75, Issue 1
July 1993
Pages 82-86

Journal of Microbiological Methods 134 (2017) 46–53

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

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



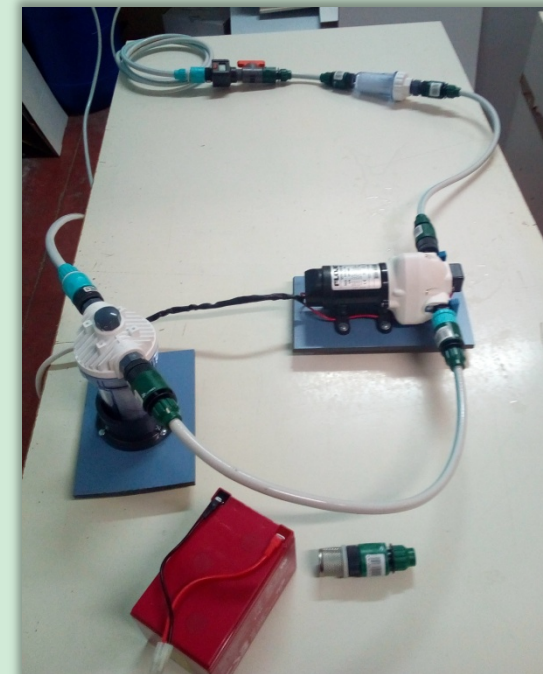
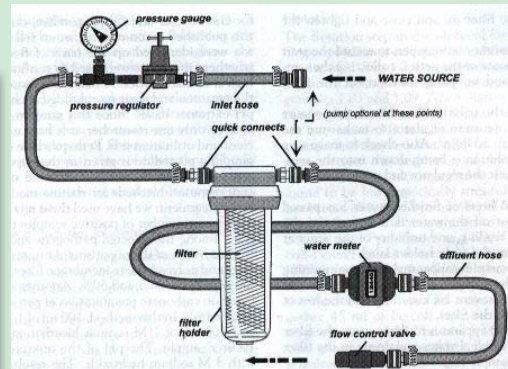
Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa

Eloy Gonzales-Gustavson^a, Yexenia Cárdenas-Youngs^a, Miquel Calvo^a, Marcelle Figueira Marques da Silva^a, Ayalkibet Hundesa^a, Inmaculada Amorós^b, Yolanda Moreno^b, Laura Moreno-Mesonero^b, Rosa Rosell^c, Liliianne Ganges^c, Rosa Araujo^a, Rosina Girones^{a,*}

^a Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

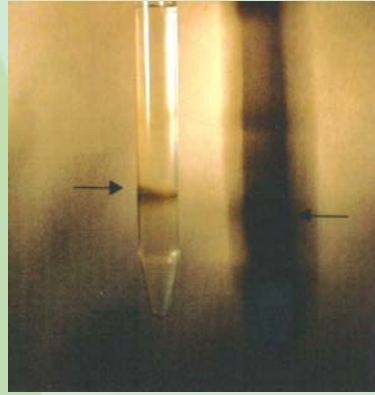
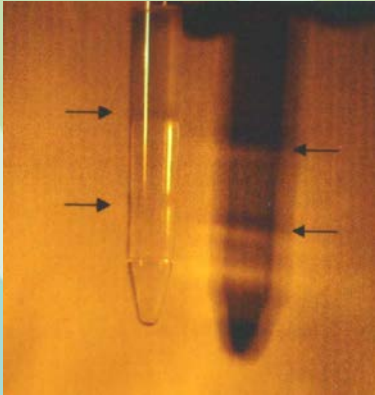
^b Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, Ciudad Politécnica de la Innovación, Ed. 8G, Acceso D, planta 2, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46102 Valencia, Spain

^c IRITA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRITA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

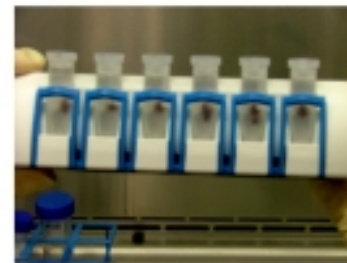
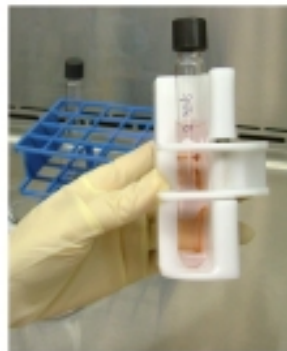


Técnicas de detección: Clarificación (Protozoos)

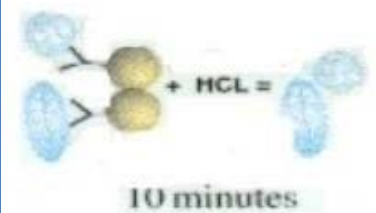
Separación por centrifugación en gradiente



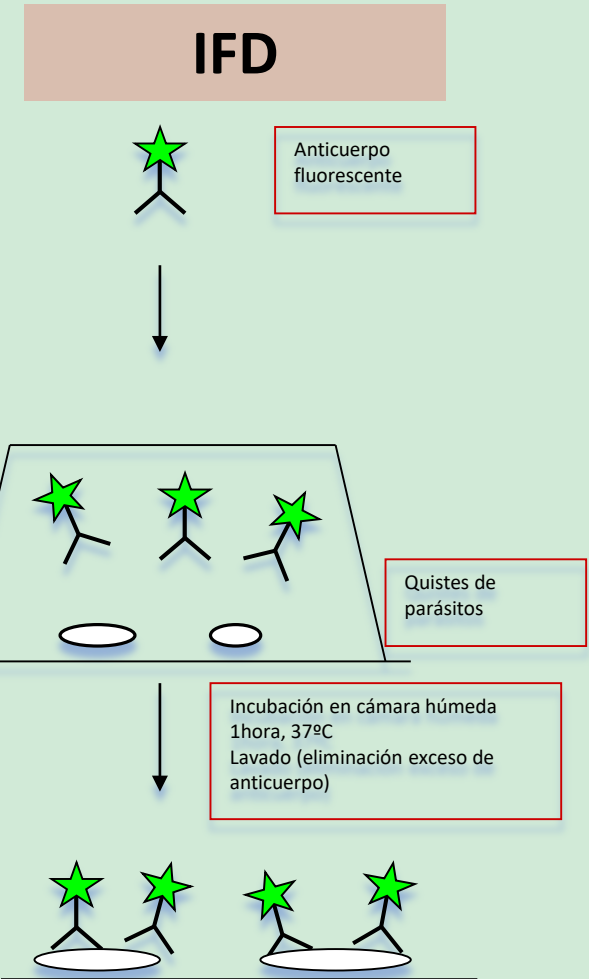
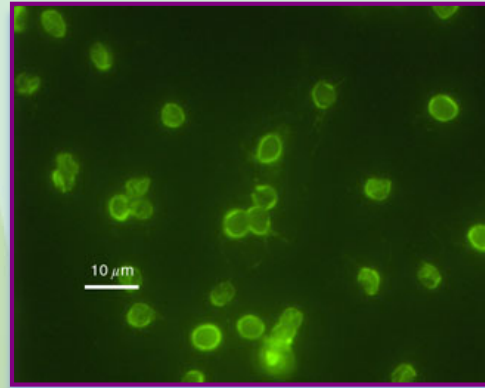
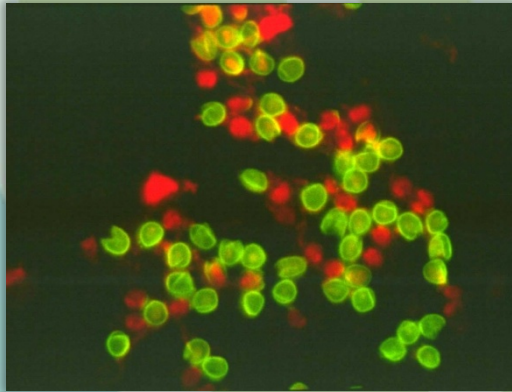
IMS



Immunomagnetic capture of organisms.



Técnicas de detección: Identificación/cuantificación



Técnicas de detección: Protozoos

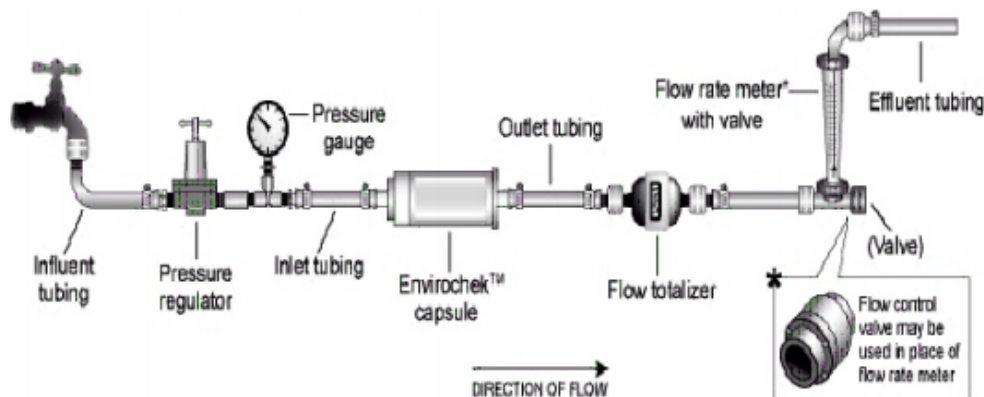
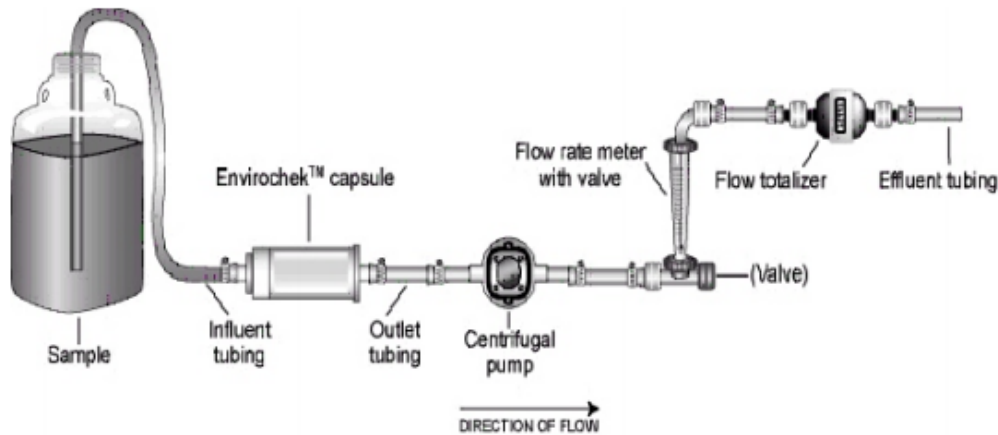


Figure 3a. Filtration Systems for Envirochek™ or Envirochek™ HV Capsule (unpressurized source - top, pressurized source - bottom)



Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA

December 2005



Técnicas de detección: Protozoos

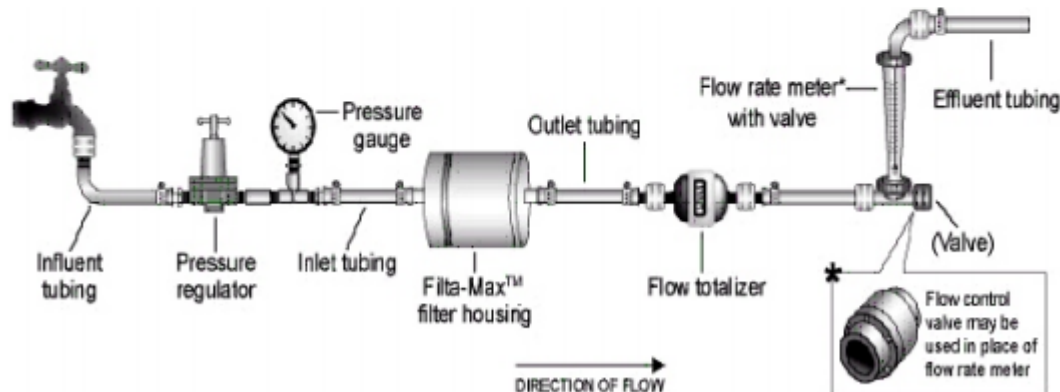
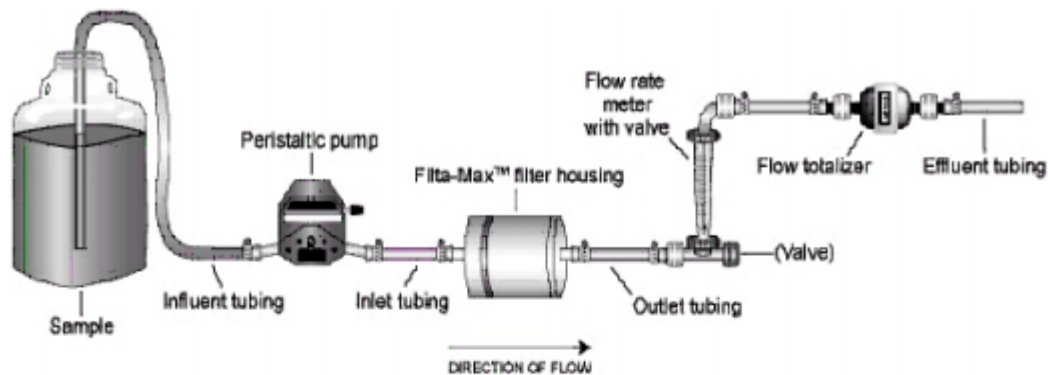


Figure 3b. Filtration Systems for Filta-Max® filters (unpressurized source - top, pressurized source - bottom)



Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA

December 2005



Técnicas de detección: Protozoos



Sistema IDEXX Filtra

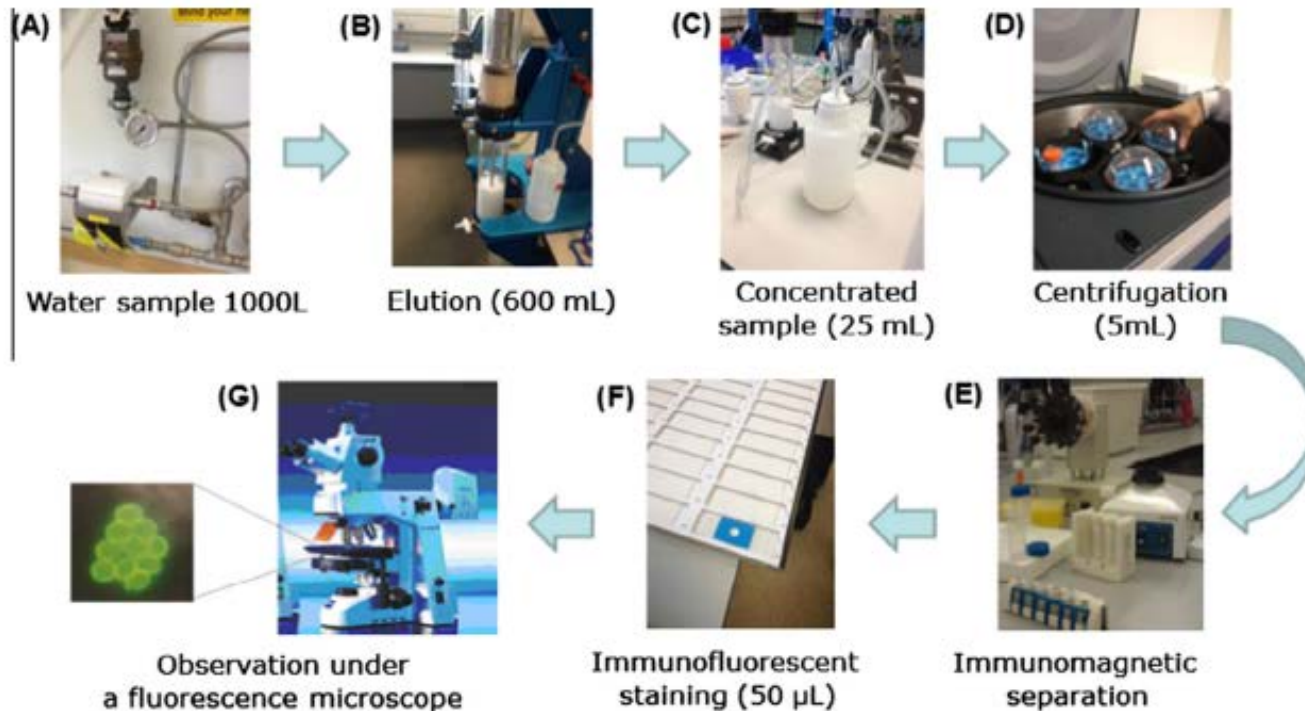
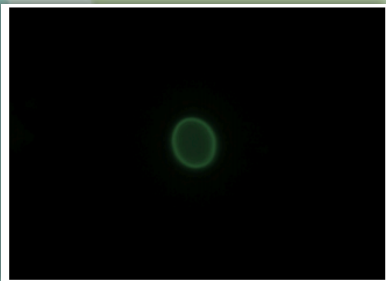


Fig. 1. Protocol of USEPA 1623.1 for *Cryptosporidium* detection process by using IDEXX Filtra-Max filters.

Técnicas de detección: Ensayos de viabilidad

- Inclusión/exclusión de colorantes vitales
- DAPI: Presencia de núcleos celulares (375nm)
- PI: Sólo penetra a través de membranas celulares dañadas (555 nm)



FITC



DAPI +



PI +

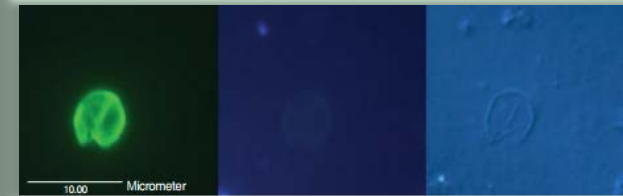


Table 4. Criteria for viability assessment of *Cryptosporidium* oocysts*

	Dead	Viable at assay	Viable after further trigger	Ghost
DAPI	Positive	Positive	Negative	Negative
PI	Positive	Negative	Negative	Negative
DIC	Visible content	Visible content	Visible content	Not visible content

- DAPI-positive: dotted sky blue colour inside the oocyst at DAPI filter
- DAPI-negative: oocyst has a continuous monochrome light blue colour without dots at DAPI filter
- PI-positive: red colour inside the oocyst at PI filter
- PI-negative: red colour visible on the outer membrane of the oocyst, not inside the oocyst

* Modified from Campbell et al. 1992

Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

- Técnicas moleculares:
 - Detección de bajo número de ooquistes
 - Tipado del parásito
 - Inconvenientes: presencia de inhibidores
 - Equipamiento especial para la rotura de ooquistes/quistes
 - Genes: SSUrRNA, HSP70, Actina, GP60, COWP..
 - Nested-PCR, RFLP, secuenciación, hibridación



Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

✓ PCR:

- Amplificación de un gen o un fragmento específico
- Ingredientes necesarios para la reacción:
 - ✓ dNTPs
 - ✓ Buffer de PCR
 - ✓ $MgCl_2$
 - ✓ Primers o cebadores
 - ✓ Agua
 - ✓ Polimerasa
- Requisitos para un buen funcionamiento:
 - ✓ Primers
 - ✓ Concentración de $MgCl_2$
 - ✓ T_m adecuada

• Inconvenientes:

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

• Ventajas:

- ✓ Rapidez
- ✓ Sensibilidad y especificidad

Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

Step 2 : annealing

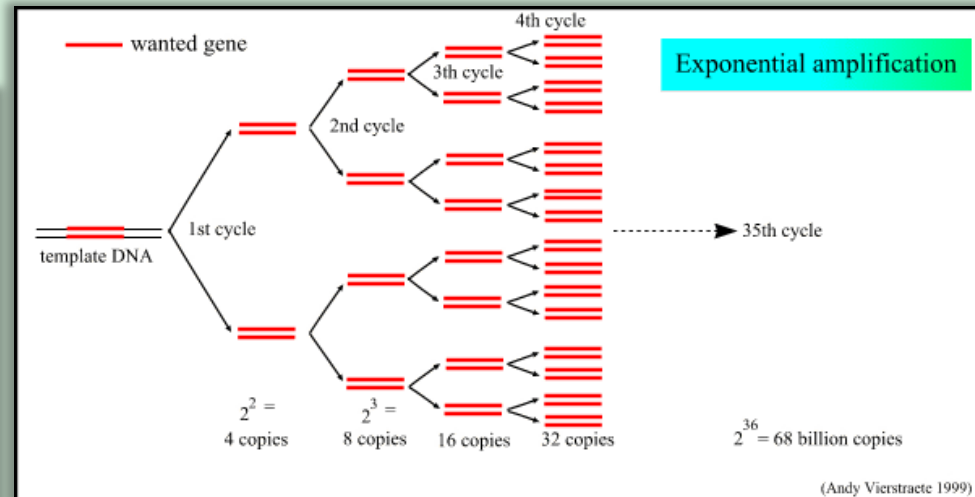
45 seconds 54 °C

forward and reverse
primers !!!

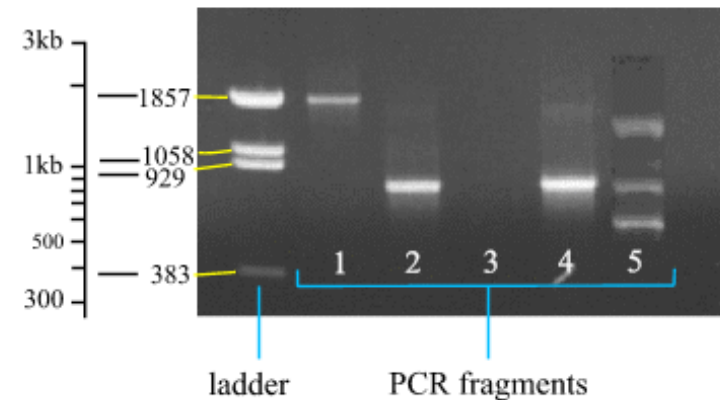
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

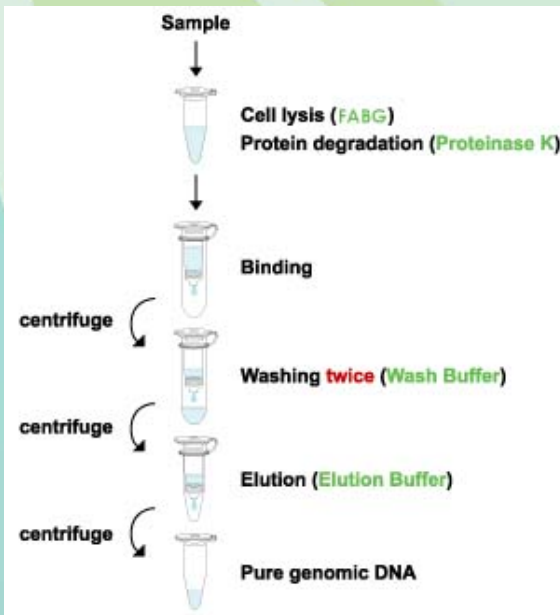
(Andy Vierstraete 1999)



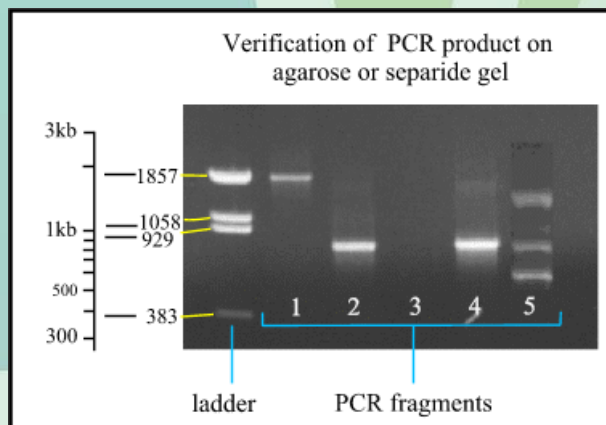
Verification of PCR product on agarose or searide gel



Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado



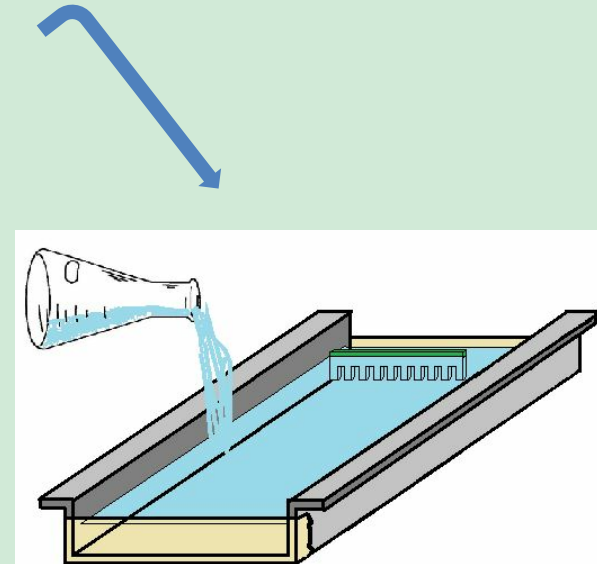
Extracción de ADN



Termociclador



Electroforesis



Gel de agarosa

Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

✓ RT-PCR:

- Estudios de viabilidad: detección de ARNm
- Componentes similares a la PCR
- Retrotranscriptasa (MMLV-II)

RNA
monocatenario



cDNA bicatenario

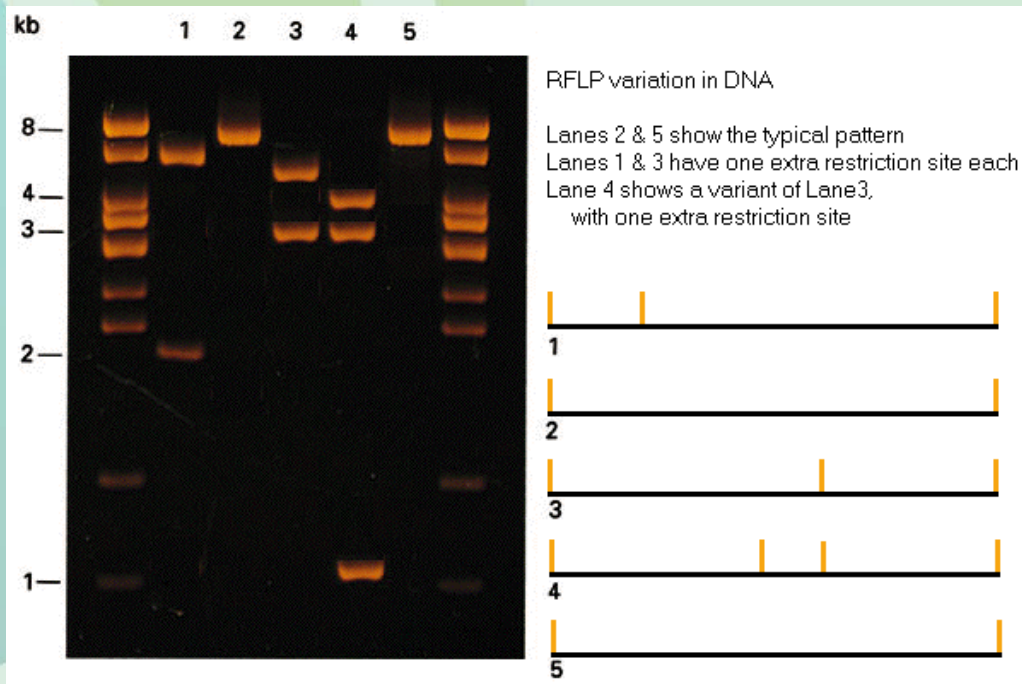
➤ Fases:

- ✓ Transcripción reversa: unión del primer a la secuencia de RNA objetivo y extensión del mismo por acción de la RT
- ✓ Obtención de cDNA tras finalizar la RT
- ✓ Inicio de la PCR

Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

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

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



5' - GAATTC - 3'

3' - CTTAAG - 5'

EcoRI

5' - GATTAAT - 3'

3' - CTAATTA - 5'

VspI

Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

PCR estándar



- ✓ Análisis de punto final
- ✓ Detección del producto por electroforesis

PCR Tiempo Real



- ✓ Análisis de la cinética de la reacción
- ✓ Detección del producto en cada ciclo

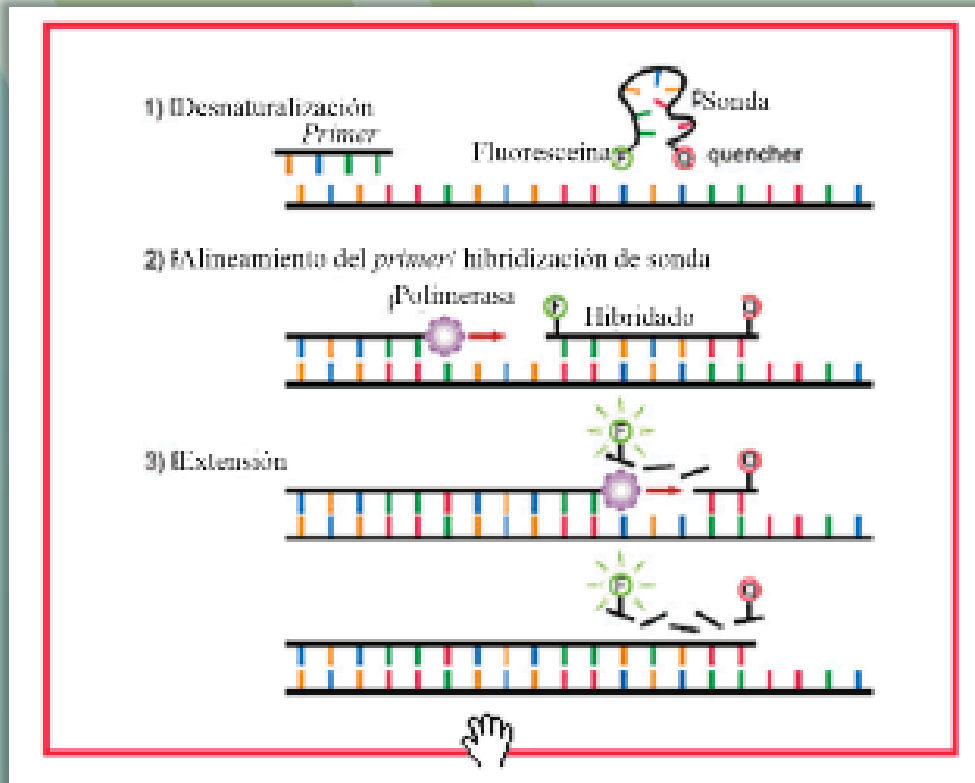
Detección del producto en cada ciclo:

- ✓ Compuestos fluorescentes:
 - Emiten fluorescencia cuando se unen a dsDNA
 - Interacción inespecífica
 - Sybr Green
 - Puede unirse a dímeros
- ✓ Sondas fluorescentes:
 - Sondas Taqman

Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

✓ PCR a tiempo real:

TaqMan PCR:



SYBR Green:

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

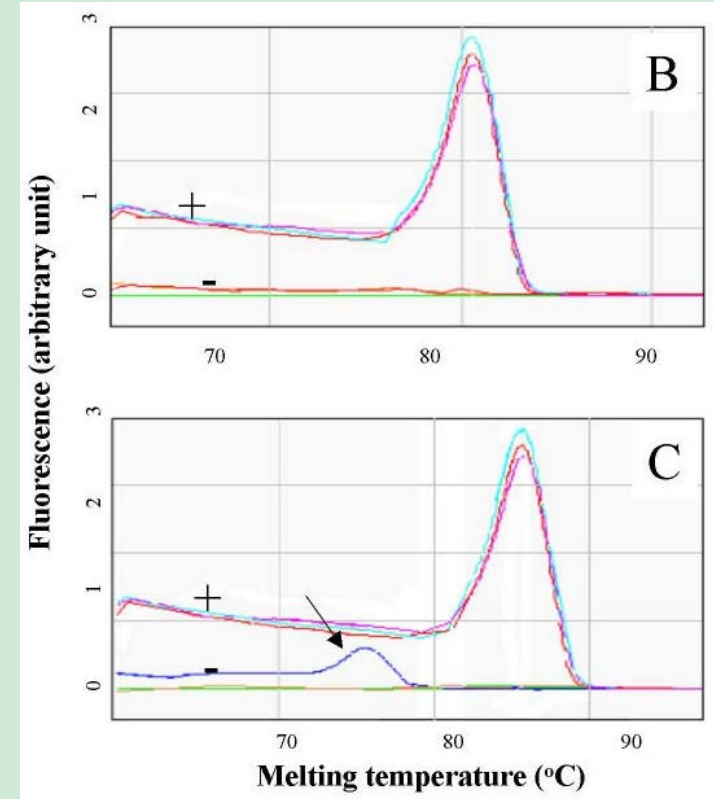


Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

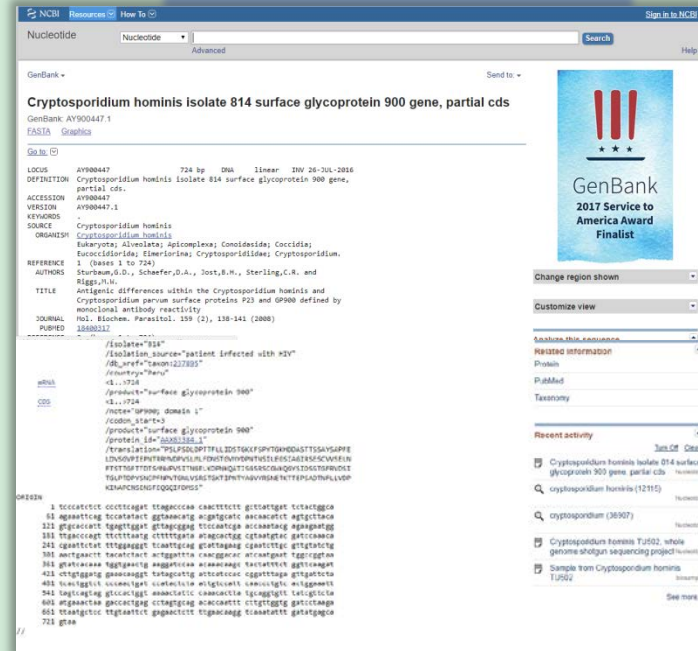
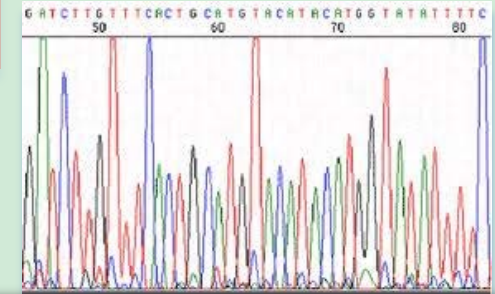
✓ PCR a tiempo real:

✓ Ventajas:

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



Secuenciación de ADN



Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

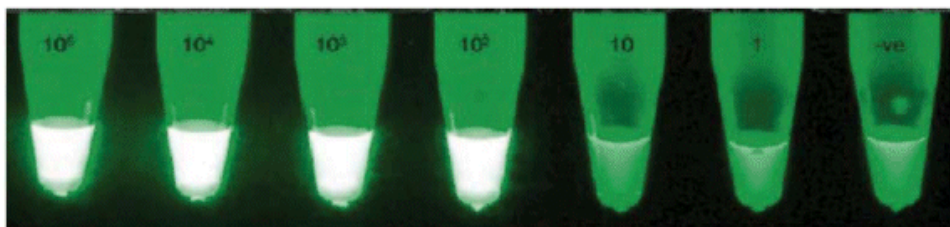
Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP

Propiedades del método LAMP

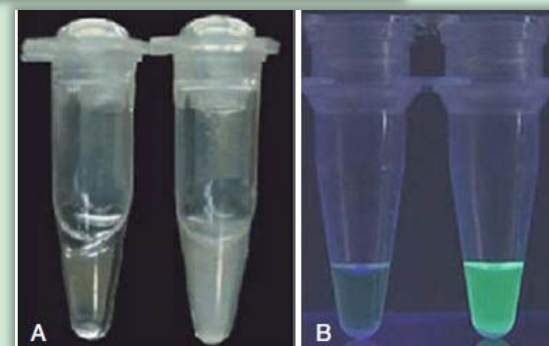
Simplicidad	Amplificación isotérmica en un solo paso Detección visual de productos amplificados
Rapidez	Resultados de las pruebas finales entre 15 a 60 minutos
Especificidad	Uso de 4 cebadores que reconocen 6 regiones distintas del DNA blanco Amplificación -Resultados positivos de la prueba
Rentabilidad	No requiere ningún reactivo especial y equipo sofisticado
Productos amplificados	Cantidad extremadamente grande (10 ⁹ -10 ¹⁰ veces dentro de 15 a 60 minutos) Diversos tamaños de las estructuras de repeticiones invertidas de forma alterna de la secuencia diana en la misma cadena
Amplificación de RNA	Amplificación isotérmica de RNA en un solo paso con sólo añadir la transcriptasa inversa

Figura 8

Detección visual mediante luz UV, para ello se usa un colorante fluorescente como el bromuro de etidio entre otros.



Fuente: Adams, E. R., et al. (2010). 591-596



Técnicas de detección: Diferenciación/genotipado

Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP

DESVENTAJAS	Cualitativa (Sí o No formato)	detección de caro equipos y consumibles	diseño complicado de cebadores (requisito para seis cebadores)
	Detección de punto final en fase de meseta	Requisito para sonda fluorescente	Dos largos cebadores de Pureza de grado HPLC
	Manejo post-PCR líder para llevar a más de contaminaciones	Restringido a laboratorios que no tengan buen apoyo financiero	Restringido a la disponibilidad de reactivos y equipos en algunos países
	Menos sensible, de ese modo faltan casos límite con bajo número de copias de genes números		
	Consumo tiempo (3-4 horas)		
	Requisito para termociclador y gel sistema de documentación		

	PCR convencional	PCR en tiempo real	LÁMP
VENTAJAS	Estándar de oro alternativo para el aislamiento en ausencia de agente en vivo	amplificación simultánea y la detección durante exponencial amplificación	amplificación del gen sin requerir termociclador
	confirmación temprana diagnóstico	Monitoreo en tiempo real de la amplificación	La amplificación puede ser logrado con baño de maria / bloque de calentamiento
	formato de diagnóstico molecular ampliamente utilizado	Cuantitativo, por tanto útiles para el seguimiento de la carga viral	En tiempo real, así como cuantitativo
		Se trabaja en tubo cerrado debido a contaminación	Altamente sensible y específico
		Aumento de la sensibilidad debido a la química fluorescente	Simple vista visual monitoreo ya sea a través de la turbidez o cambio de color por intercalante fluorescente colorante (SYBR Green I)
		Alto rendimiento análisis debido al software operación impulsada	

Helmintos parásitos

- Animales invertebrados vermiformes
- Presentes en heces humanas y animales
- Características epidemiológicas
 - ✓ Alta persistencia en el ambiente
 - ✓ Baja dosis infectiva
 - ✓ Baja respuesta inmune
 - ✓ Viables en el suelo durante largos periodos de tiempo
- Distintas rutas de transmisión
 - ✓ Ingestión de hospedadores intermediarios
 - ✓ Penetración por la piel y mucosas
 - ✓ Ingestión de verduras regadas con aguas residuales
- Mayores riesgos debido a helmintos que a virus o bacterias
 - ✓ Más resistentes en el ambiente
 - ✓ No suelen desarrollar una inmunidad

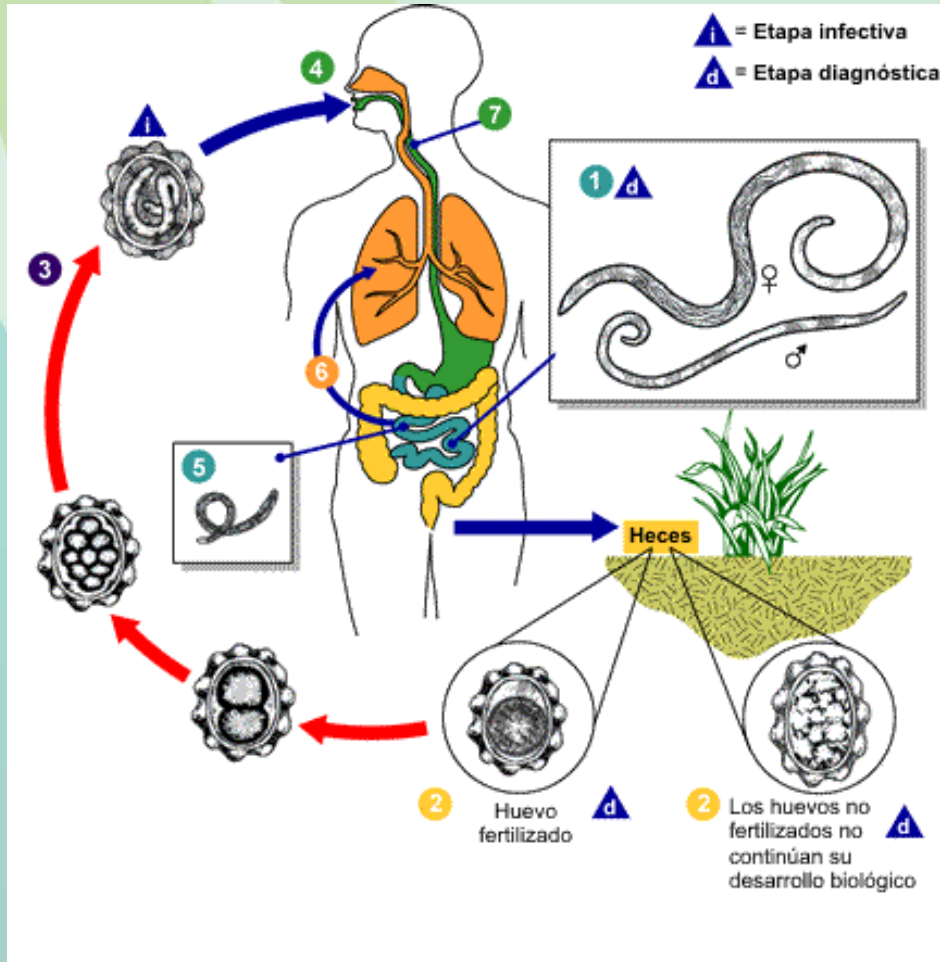


Decreto Regulamentar
nº 4/2020

Helmintos parásitos

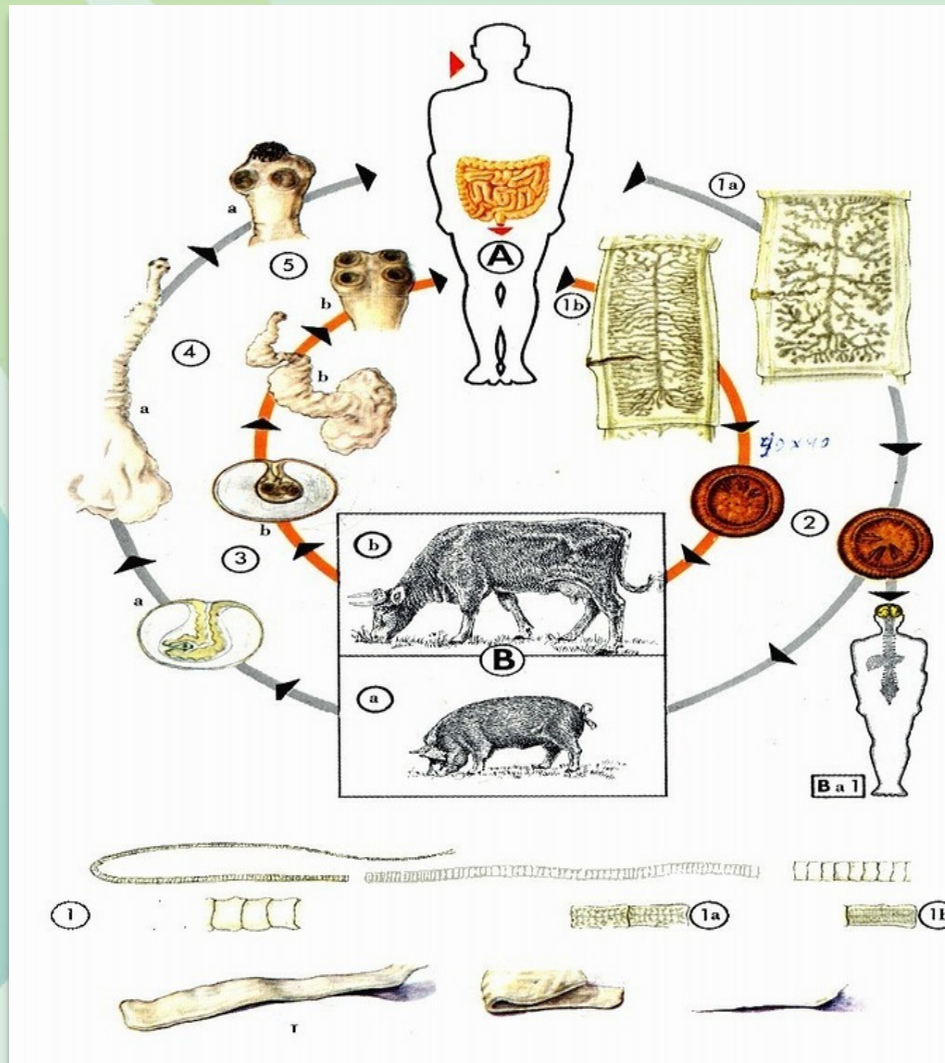
Helmintos	Enfermedad principal	Origen
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	H. humanas/suelo
<i>Ascaris suum</i>	Ascariasis	H. animales/suelo
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anquilostomiasis	H. humanas/animal
<i>Necator americanus</i>	Anquilostomiasis	H. humanas/animal
<i>Trichuris trichiura</i>	Tricurasis	H. humanas/suelo
<i>Taenia saginata</i>	Cisticercosis	Vacas y vegetales/suelo
<i>Taenia solium</i>	Cisticercosis	Cerdos y vegetales/suelo
<i>Schistosoma</i> sp.	Esquistosomiasis	Aguas/ h. intermediarios acuáticos

Helmintos parásitos



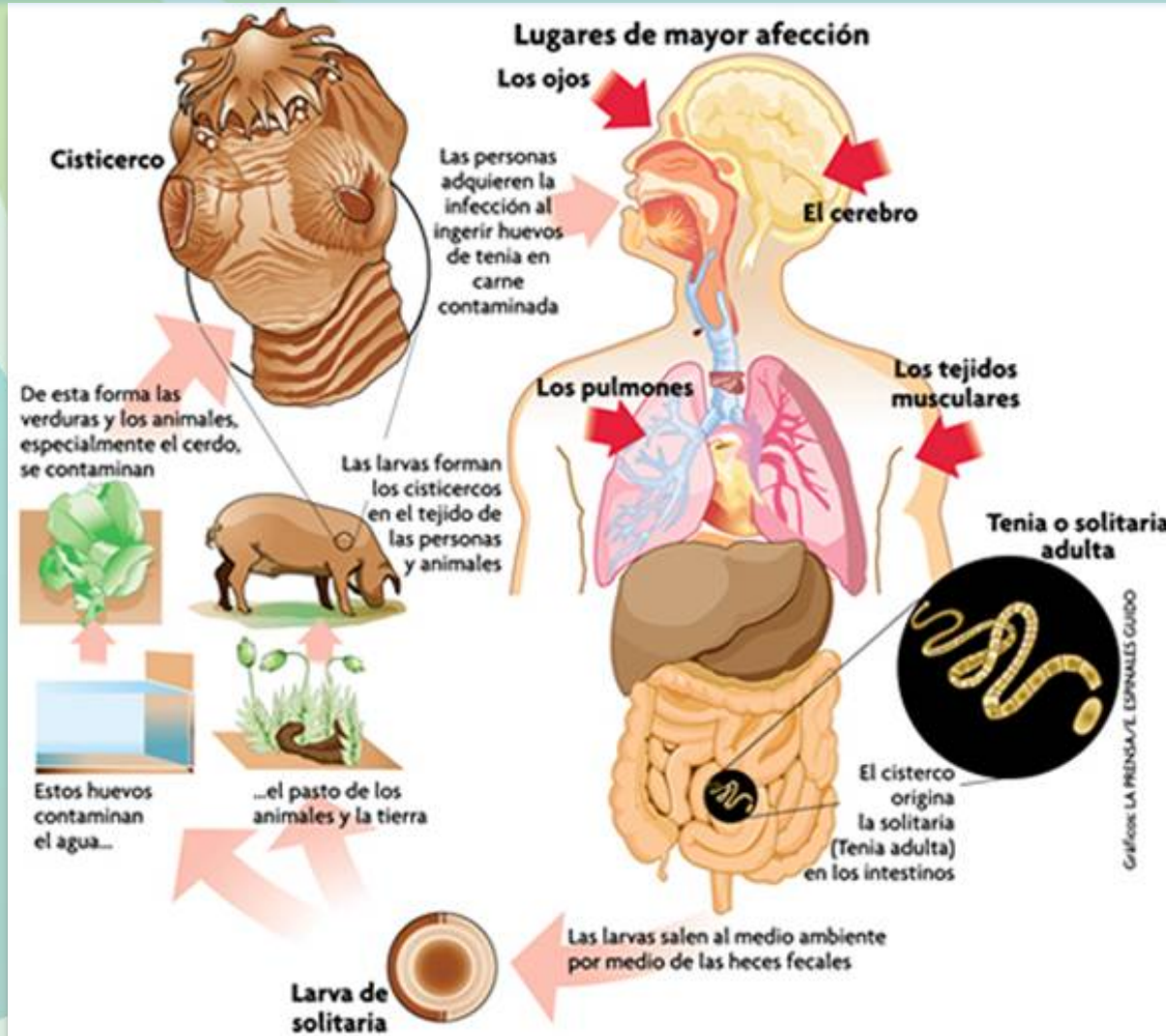
Ascaris sp.

Helmintos parásitos



Taenia saginata/solium

Helmintos parásitos



*Taenia
saginata/solium*

Helmintos parásitos

- Sistema convencional de tratamiento poco eficaz
- Sedimentación / Coagulación
- Filtración
- Lagunaje
- Desinfección poco efectiva
- Inactivación por fotocátalisis homogénea (Co^{2+} y Fe^{2+})

	Sedimentación Primaria sencilla	Con ayuda química	Lodos activados	Biofiltración	Laguna ventilada	Desinfección	Lagunas de estabilización
Helmintos	0-2 $\log_{10}$	1-3 $\log_{10}$	0-2 $\log_{10}$	0-2 $\log_{10}$	1-3 $\log_{10}$	0-1 $\log_{10}$	1-3 $\log_{10}$



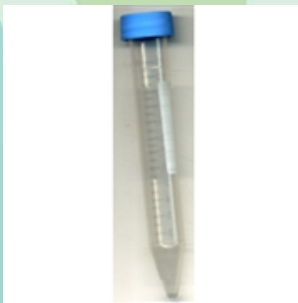
Helmintos parásitos: Detección



1. Etapa concentración



2. Etapa desorción



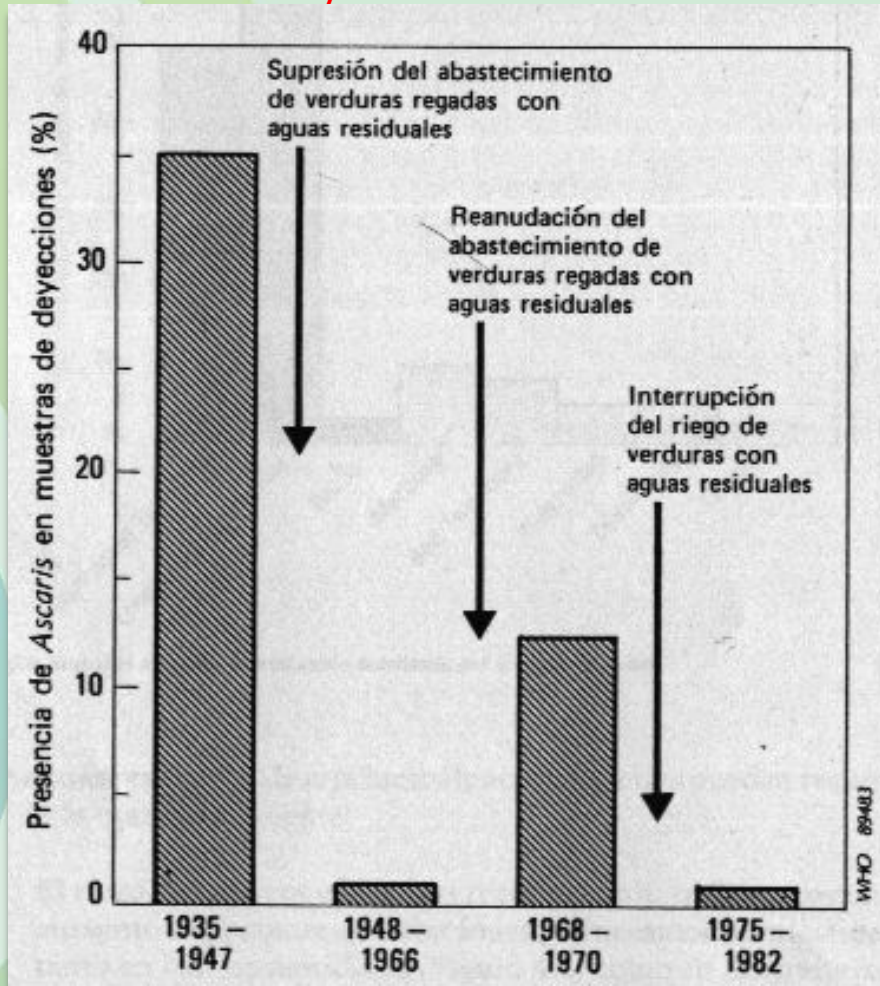
3. Etapa de flotación



4. Etapa de recuento

Helmintos parásitos

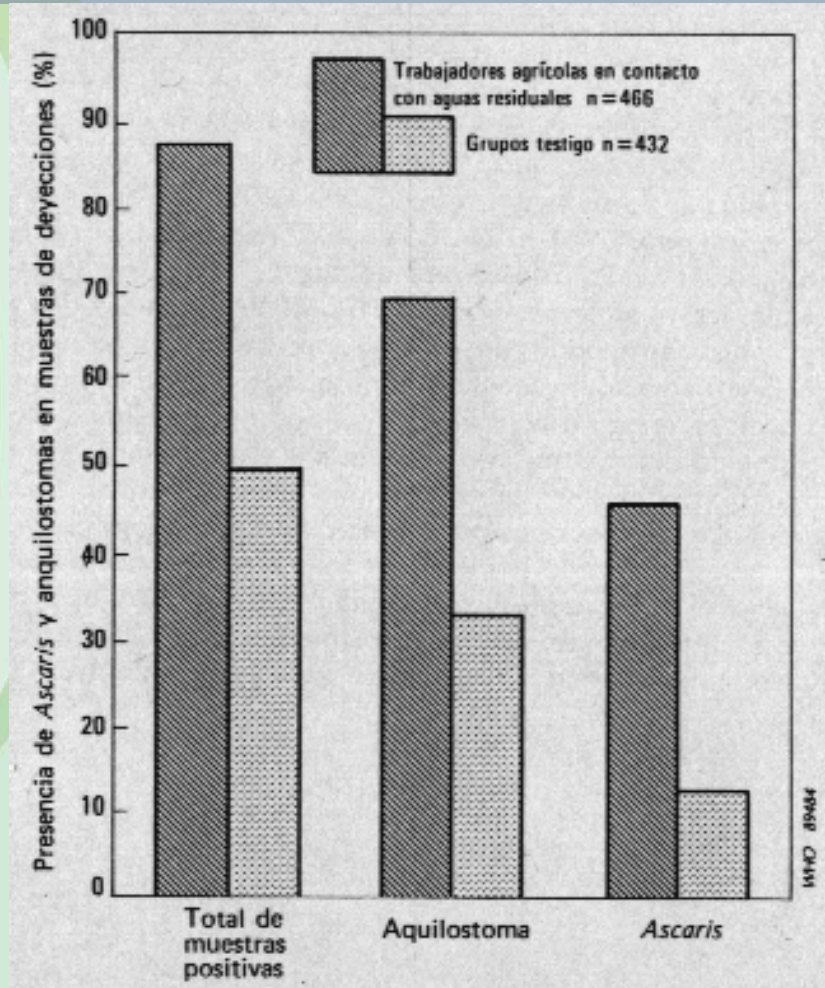
Reutilización de AARR/AADD:



Presencia de *Ascaris* en la población de Jerusalén en función del riego con aguas residuales

Helmintos parásitos

Prevalencia de anquilostoma y *Ascaris* en trabajadores agrícolas en contacto con aguas residuales, India



Virus entéricos

- Más de 140 tipos distintos de virus en AARR
- Gran variedad de familias
 - Morfología, tamaño y complejidad genómica
 - Mayor potencialidad en la transmisión hídrica
 - Excreción en grandes cantidades: presencia en AARR
- Parásitos intracelulares obligados (no hay multiplicación ambiental)
- Baja respuesta inmune
- Tratamientos:
 - Fangos activados: Reducción del 95% (contaminación elevada)
 - Mecanismos inactivación/eliminación no claros (eliminación física: adsorción)
 - Filtración con desinfección activa (Cloración, dependen Tª, pH)
 - UV (Turbidez)
- Adenovirus: buenos indicadores moleculares
- Indicadores bacterianos: no útiles.

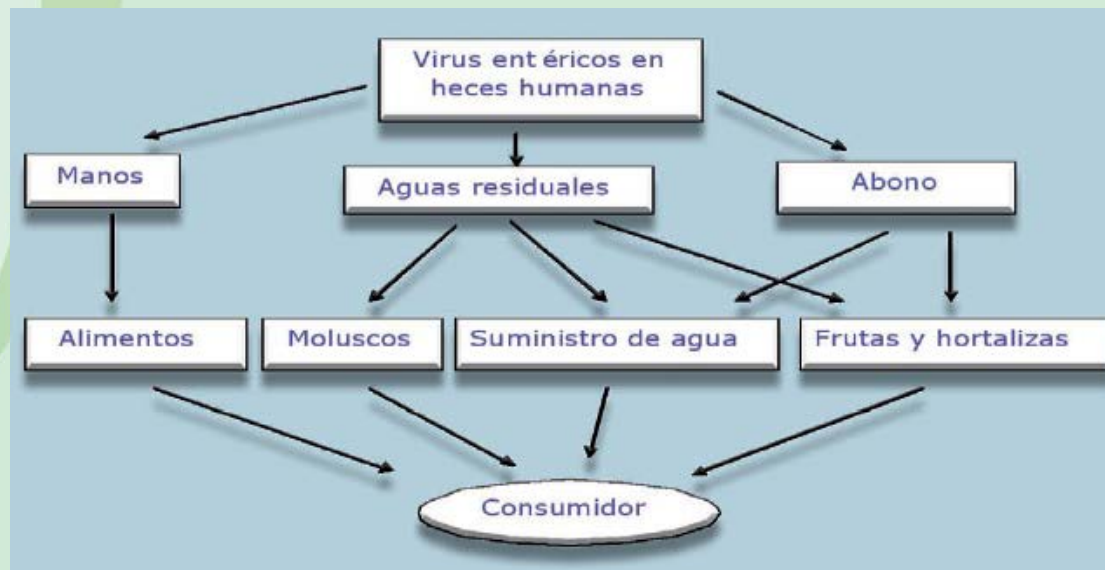
Virus entéricos

Virus entéricos	Enfermedad principal	Origen
Poliovirus	Poliomielitis	H. humanas
Coxsackievirus	Enf. aparato resp. superior	H. humanas
Echovirus	Enf. aparato resp. superior	H. humanas
Rotavirus	Gastroenteritis	H. humanas
Norovirus	Gastroenteritis	H. humanas
Virus hepatitis A	Hepatitis infecciosa	H. humanas
Virus hepatitis E	Hepatitis	H. humanas
Astrovirus	Gastroenteritis	H. humanas
Adenovirus entérico	Gastroenteritis	H. humanas

Virus entéricos

- **Estabilidad vírica:**

- Poblaciones remanentes de virus resistentes a la eliminación
- Persistencia en materia seca variable
 - ✓ Depende de la humedad y materia fecal presente
- Persistencia en aguas (T90)
 - ✓ Enterovirus: 14-288 h
 - ✓ >1 año rotavirus y poliovirus; 300 d para AdV 41
- Función de: tipo de agua, iluminación, turbidez y pH



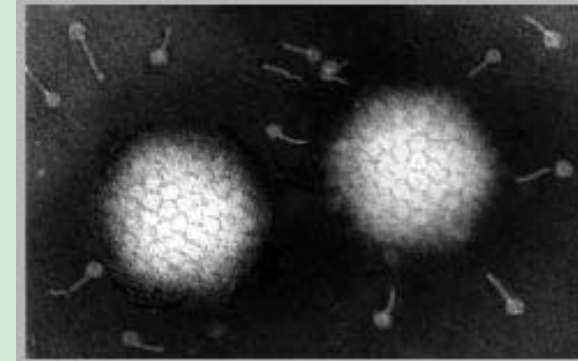
Virus entéricos: Adenovirus

- Icosaédricos, ADN
- 51 serotipos
 - ✓ 30% patógenos humanos
 - ✓ Muchos son patógenos de vías respiratorias superiores (aerosoles respiratorios)
 - ✓ Buena multiplicación en el digestivo y presencia en heces
- Tipos 40 y 41: inducen gastroenteritis. 5-20% de admisiones por diarreas USA (< 2 años)
- Alta frecuencia en aguas y moluscos
- Asociación de otras cepas en otros brotes:
 - ✓ Conjuntivitis y faringitis
 - ✓ Exposición a aguas contaminadas (fines recreativos)



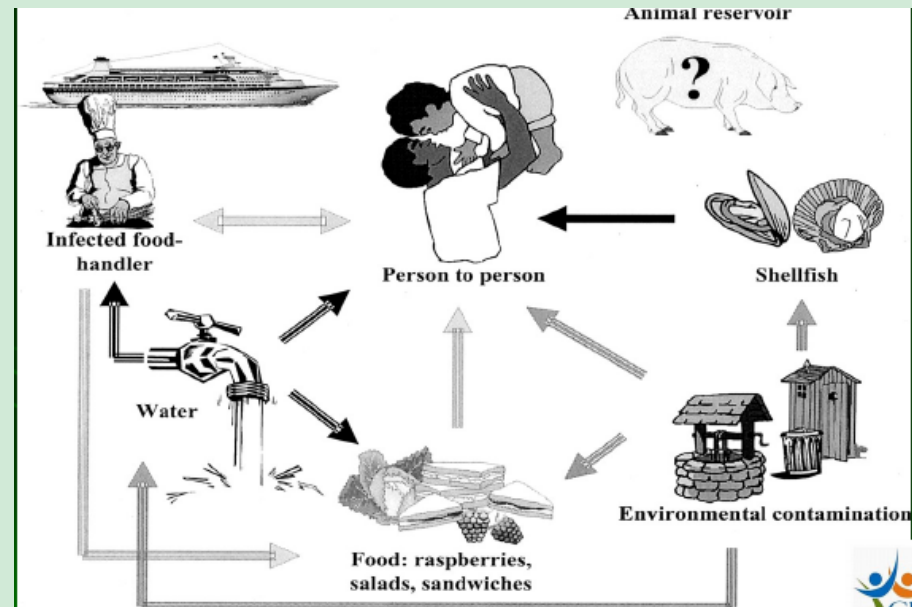
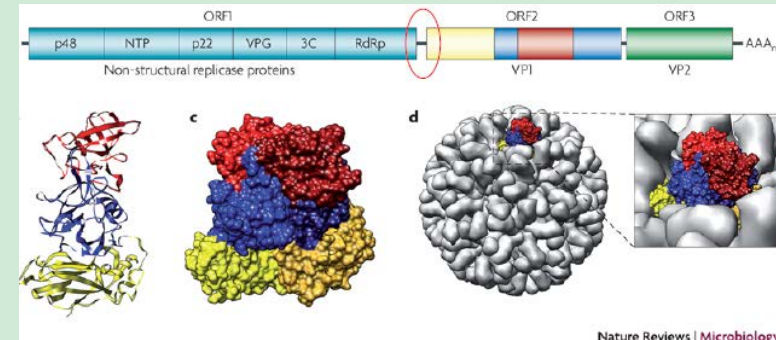
Virus entéricos: Adenovirus

- Periodo de incubación: 3-10 días
- Sintomatología: diarreas acuosas (hasta 1 semana)
- Edad: aumenta los niveles de inmunidad
 - Sólo 20% <6 meses presentan Ak
 - >3 años 50% con Ak
- FSA (Inglaterra, 2000)
 - < 5 años: 12% diarreas producidas por AdV
 - Incidencia: 400 o 800 casos/ 100.000 personas/año en 2 grupos (0-1 y 1-4)
- Incidencia aumenta en la 3^{era} edad



Virus entéricos: Norovirus

- Género de la familia *Caliciviridae* (forma de copa)
- Formado por una especie: Virus de Norwalk
- Genoma de ARN de sentido positivo de 7,5 kb
- 5 genogrupos (G1, G2 infectan a humanos)
- Partícula vírica entre 27-38 nm
- Inmunidad escasa: protección durante pocos meses
- Virus que produce en 90 % de brotes de gastroenteritis no bacterianos
- Responsables de la mayoría de los brotes alimentarios (involucrados el agua)
- Síntomas:
 - ✓ Gastroenteritis aguda entre 24-48 h de la exposición. Duración de 24-60 h
 - ✓ Náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal (pérdida de gusto)
 - ✓ Letargo general, debilidad, dolores musculares, dolor de cabeza y fiebre baja



Virus entéricos: Norovirus

Environment International 123 (2019) 282–291

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

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



Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing

Tulio M. Fumian^{a,b,*}, Julia M. Fioretti^{b,1}, Jennifer H. Lun^a, Ingrid A.L. dos Santos^b, Peter A. White^a, Marize P. Miagostovich^b

^a Faculty of Science, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

^b Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil



T.M. Fumian et al.

Environment International 123 (2019) 282–291

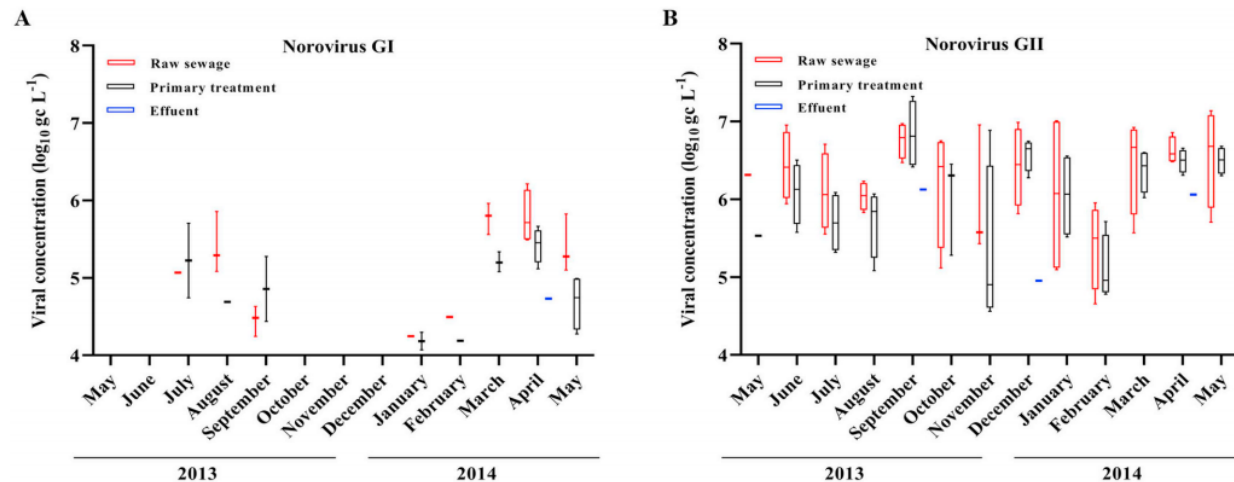
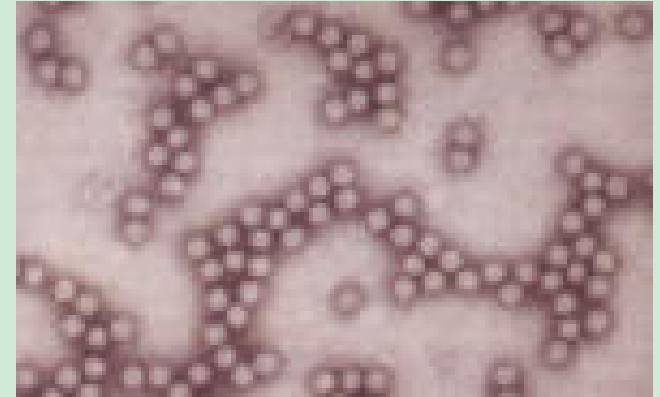


Fig. 1. Box-and-whisker plots showing the monthly profile of norovirus GI and GII in wastewater samples. Norovirus GI (A) and GII (B) distribution and viral load in raw sewage, primary treatment and final effluent samples weekly collected over a 13-month period of a wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. Box and whisker plots show the first and third quartiles (equivalent to the 5th and 95th percentiles), the median (the horizontal line in the box) and range concentrations [$(\log_{10} \text{ genome copies per litre (gc L}^{-1})$).

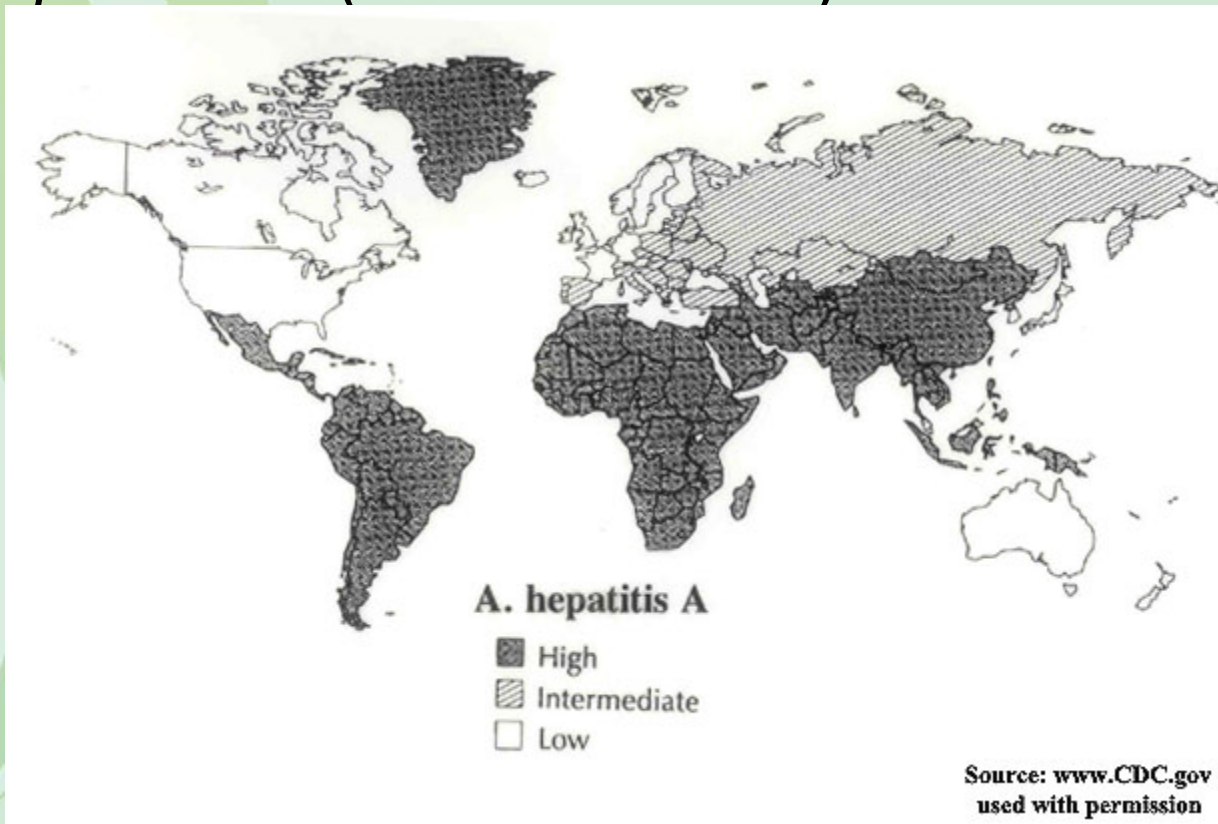
Virus entéricos: Hepatitis A

- Epidemias de hepatitis desde tiempos remotos
- 1972 reconocimiento de HVA: identificación de partículas por inmuno-microscopia electrónica
- Responsable de brotes masivos de hepatitis infecciosa
- Síntomas en adolescentes y adultos. En niños libre de síntomas
- Miembro de Picornavirus; Gen *Enterovirus* (inicialmente)



Virus entéricos: Hepatitis A

- Estructura genética y modo de replicación :
Gen. *Hepatovirus* (único miembro)



Virus entéricos: Hepatitis A

60

Occupational and Environmental Medicine 1997;54:60-62

SHORT REPORT

Hepatitis A among workers from a waste water treatment plant during a small community outbreak

Gaston De Serres, Denis Laliberté

Abstract

Objective—This is a case report describing the occurrence of hepatitis A in three workers at a waste water treatment plant during a small community outbreak involving 16 cases.

Case report—The first case was a 26 year old operator who had worked in the plant for two years, the second was a 23 year old employee hired to add new biolite in the

workers at the waste water treatment plant during this small community outbreak and the results of the ensuing investigation.

Setting

This waste water treatment plant was opened in 1991 and all installations are indoor. It includes primary treatment by decantation and secondary treatment by biofiltration.

3 Casos:

- Operador de 26 años
- Operador trat. 2º 23 años
- Operador de ventilación de 34 años
- Casos confirmados por IgM /PCR en heces
- No se encontró otros factores de riesgo de Hepatitis A

- HVA es un riesgo laboral para operarios de EDAR
- Fuentes potenciales de contaminación asociada a esta ocupación: vacunación (prevención eficaz)

Virus entéricos: Hepatitis E

- Virus ARN con genoma muy estable
- 4 grandes genotipos
 - III: cepas autóctonas zonas industrializadas (US y Europa)
- Enfermedad aguda (no crónica)
- Síntomas: Hepatitis
- Hepatitis fulminante; mortalidad:
 - 1% de la población
 - Incremento en mujeres embarazadas 3^{er} trimestre

Virus entéricos: Hepatitis E

- 80-100% cerdos en granjas EEUU seropositivos
- Resultados similares en regiones endémicas y no endémicas para humanos
- Cataluña:
 - 20% seroprevalencia en humanos
 - Identificación 2 cepas origen porcino en aguas residuales y muestras clínicas
 - Ak en ratas, gatos, primates, jabalíes y ciervos
- Características epidemiológicas:
 - Transmisión fecal-oral
 - Brotes asociados al agua (zonas sanitarias deficientes)

Virus entéricos: Hepatitis E

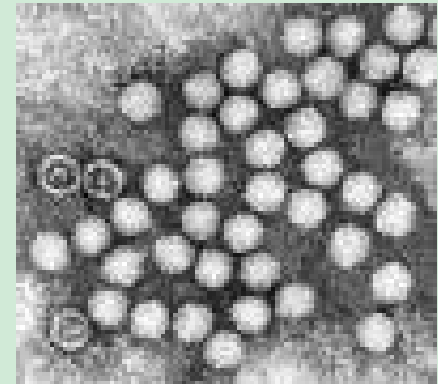
- Mayor tasa entre 15-40 años
 - Mayor tasa de mortalidad en mujeres embarazadas
 - Baja tasa de transmisión por contacto persona-persona
 - Ausencia de secuelas o cronicidad
 - Casos esporádicos: 50% hepatitis agudas virales en países emergentes
- Países industrializados:
 - Consideradas zonas no endémicas con casos esporádicos (cepas importadas)

Virus entéricos: Hepatitis E

- Detección en zonas no endémicas de cepas propias (suero y aguas residuales)
- Seroprevalencia: 1-3% (muy alta para ser por importación)
- 90% inactivación en agua residual: 20 días (20°C)
- ARN en 53,8% de muestras agua residual (20 secuencias distintas)

Virus entéricos: Enterovirus

- Infectan el intestino
- Englobados en la fam. Picornavirus
- Incluyen:
 - Echo virus
 - Cocksackie virus
 - Poliovirus
- Campañas de vacunación: eliminación de la polio
- Sintomatología variada
 - Gastroenteritis
 - Conjuntivitis
 - Sistema nervioso



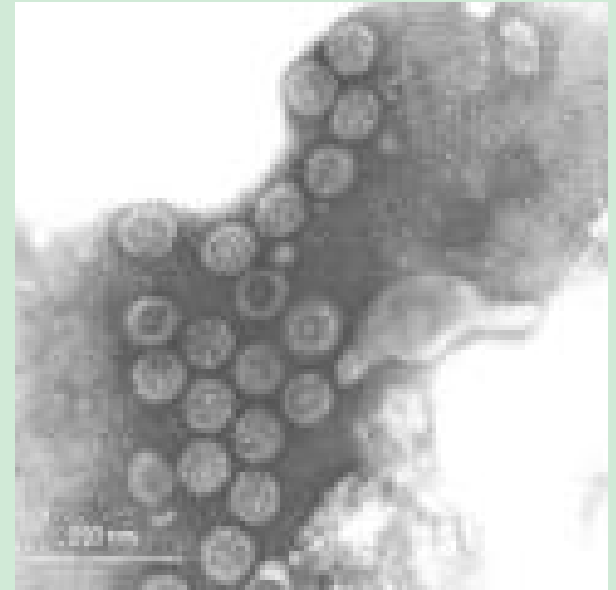
Virus entéricos: Enterovirus

- Muy frecuentes en aguas residuales
- Polio: primer indicador vírico acuático



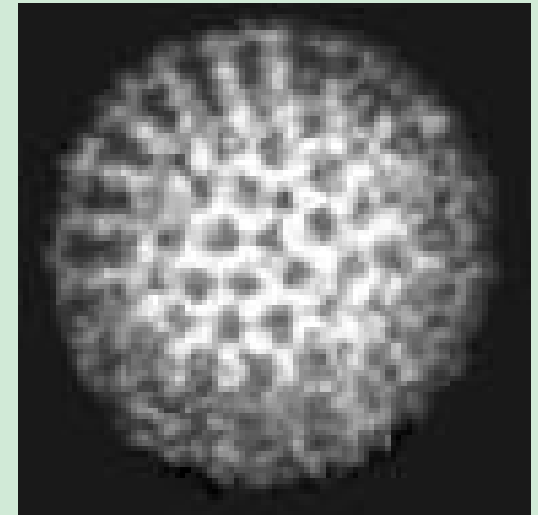
Virus entéricos: Rotavirus

- Familia Reoviridae (RNA)
- Viriones con morfología característica (forma de rueda)
- Agentes etiológicos habituales de diarrea infantil en todo el mundo. Asintomática en adultos
- Relativamente estables a Tª, detergentes, pH extremos, congelaciones y descongelaciones repetidas.

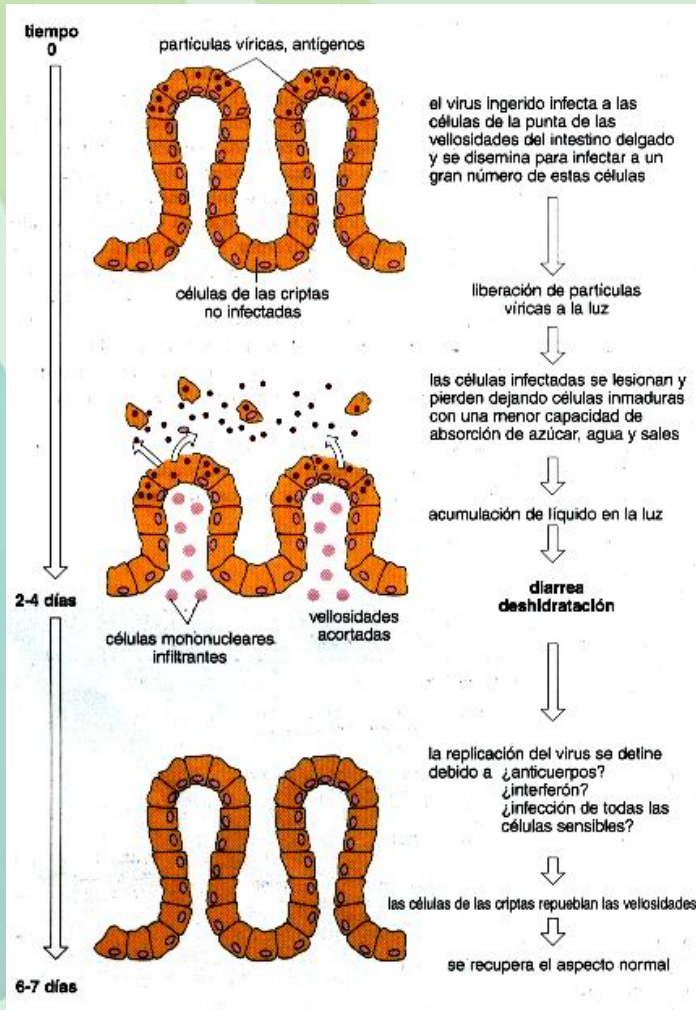


Virus entéricos: Rotavirus

- Capacidad infectiva reforzada por enzimas proteolíticos
- 7 grupos de rotavirus (A-G). VP6
 - En humanos: grupo A y ocasionalmente grupo B y C
- Excretados en gran número:
 $10^9/\text{gr}$



Virus entéricos: Rotavirus



■ Cápside resistente a condiciones ambientales y gastrointestinales

■ Eliminación en grandes cantidades en fase de diarrea

■ Infección asintomática con liberación de virus

■ Acción citolítica y tóxica provoca pérdida de líquidos y electrolitos grave. Muerte

■ Transmisión oral-fecal y respiratoria

■ Dosis infectiva baja. Baja inmunidad

Virus entéricos: Rotavirus

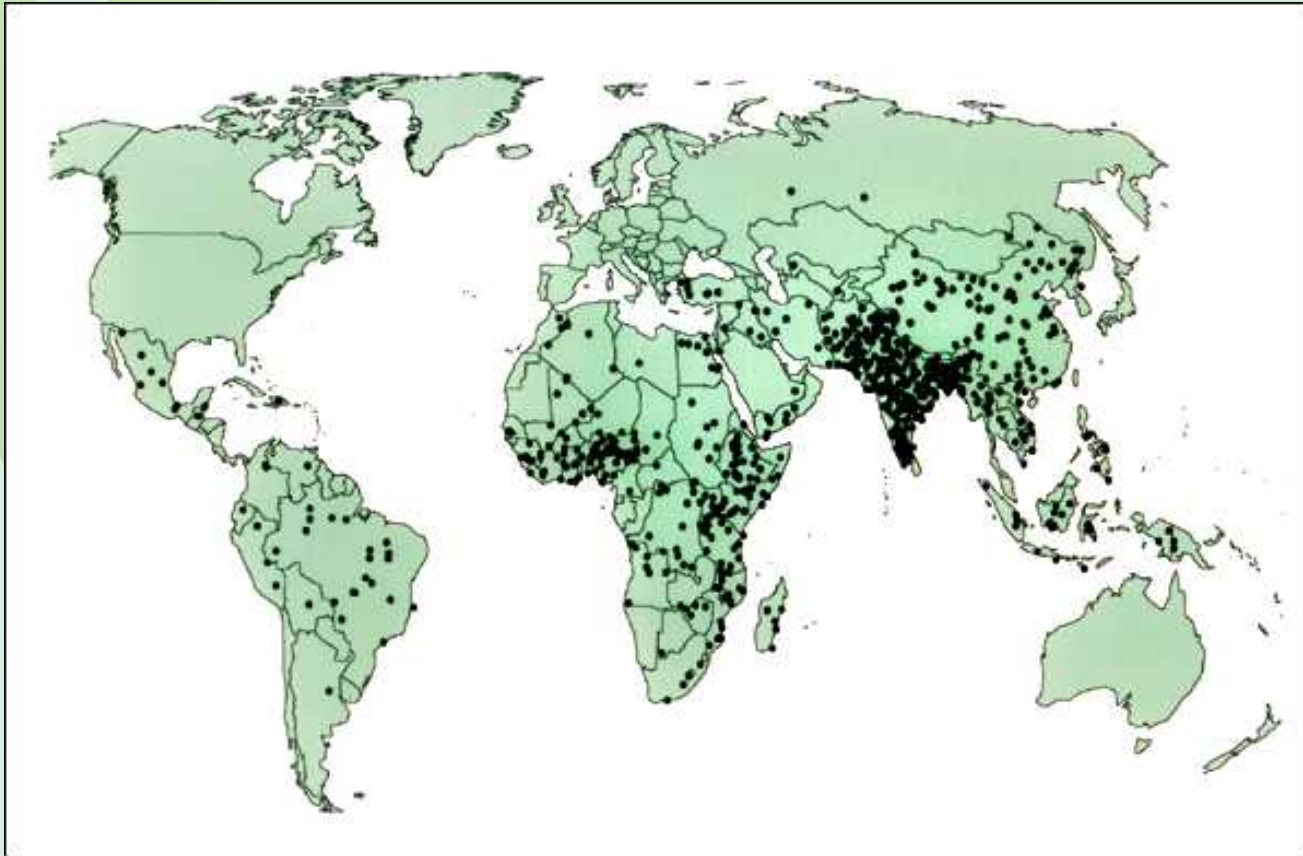
- Causa de diarreas graves en niños en todo el mundo: 600.000 muertes por deshidratación
- Incubación de 48 horas. Vómitos, diarrea, fiebre y deshidratación
- Mayoría de los niños infectados a los 4 años
- Muy contagiosa, frecuente desenlace fatal en países en desarrollo. Durante todo el año
- Rotavirus tipo A:
 - Lactantes menores de 24 meses (deshidratación)
 - Niños mayores y adultos: diarrea leve
 - Individuos desnutridos: diarrea, deshidratación y muerte

Virus entéricos: Rotavirus

- Rotavirus tipo B:
 - Lactantes, niños mayores y adultos en China: Gastroenteritis grave
 - Mayor frecuencia en otoño, invierno y primavera
 - Métodos de control:
 - Lavado de manos y aislamiento de casos conocidos
 - Vacunas vivas experimentales con rotavirus bovinos y de mono.
- Vacunas recombinantes Rhesus-humana



Virus entéricos: Rotavirus



1 PUNTO = 1000 muertes

Virus entéricos: Rotavirus



Pergamon

Wat. Res. Vol. 30, No. 12, pp. 2929-2940, 1996
Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0043-1354/96 \$15.00 + 0.00

PII: S0043-1354(96)00187-X

WATERBORNE ROTAVIRUS: A RISK ASSESSMENT

CHARLES P. GERBA¹*, JOAN B. ROSE², CHARLES N. HAAS³
and KRISTINA D. CRABTREE¹

¹Department of Soil, Water and Environmental Science, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, U.S.A., ²Department of Marine Science, University of South Florida, St. Petersburg, FL 33701, U.S.A. and ³Department of Civil and Architectural Engineering and Environmental Studies Institute, Drexel University, Philadelphia, PA 19104, U.S.A.

(First received March 1996; accepted in revised form May 1996)

Table 5. Occurrence of rotavirus in treated sewage

Country	Number of samples	Percent positive	Volume of sample (liters)	Concentration (per liter)		Type of treatment	Reference
				Range	Average number		
Brazil	19	100	5-10	180-8400	733	Anaerobic, 5 day retention (1986)	Oragui <i>et al.</i> (1989)
				560-9000	670	Anaerobic, 8 day retention (1987)	
	19	100	5-10	180-8400	733	Facultative, 5 day retention (1986)	
				40-4300	529	Facultative, 8 day retention	
	19	NA	5-10	0-18	2	After three maturation ponds, follow with anaerobic pond (1986); 15 day retention (1987)	
				0-26	6	15 day retention	
South Africa	NA	55.5	NA	NA	NA	Detection limit of 1 TCID ₅₀ (treatment not specified)	Genthe <i>et al.</i> (1991)
United States	7	100	20	7.5-374	1687	Detection limit of 150 per liter	Smith and Gerba (1982)
United Kingdom	2	50	0.2	0-1500	750	Activated sludge, no disinfection	Bates <i>et al.</i> (1984)
United States	7	100	14	48-3228	1012	Activated sludge, unchlorinated	Rao <i>et al.</i> (1988)
	14	21	14	0-32	9.6		

NA = not available.

Table 4. Occurrence of rotavirus in raw sewage

Country	Number of samples	Percent positive	Volume of sample (liters)	Concentration (per liter)		Remarks	Reference
				Range*	Average number		
Bolivia	3	100	4	100-250	163		Toranzos <i>et al.</i> (1988)
Colombia	9	100	4	10-2214	389		Toranzos <i>et al.</i> (1988)
Brazil	19	100	5-10	99-650,000	90,700	1986	Oragui <i>et al.</i> (1989)
				5090-96,000	30,700	1987	
Brazil	9	100	8	< 3.0-63.0	2.0	Obtained from a sewage pumping station	Mehnert and Stewien (1993)
Spain		100		25-653	156		Bosch <i>et al.</i> (1988)
United States	39			< 1-321	9.8	Sensitivity of 1 per liter	Hejkal <i>et al.</i> (1984)
					(geometric)		
United States				< 150-374	75	Sensitivity of 125 per liter	Smith and Gerba (1982)
Spain	9	100		1000-14,000	5407		Bosch <i>et al.</i> (1988)
United States	33	100	7	14-2980	443		Rao <i>et al.</i> (1987)
Spain	23	100	20	36-653	218		Bosch <i>et al.</i> (1988)

*Arithmetic average, including negative samples.

Poliomavirus (Virus emergentes)

- Pequeños, icosaédricos
- ADN circular superenrollado de doble cadena (5,2 kb)
- Antígenos T y t: proteínas multifuncionales con cierto potencial oncogénico
- Dos tipos en el hombre: JC y BK
- JC:
 - Aislado 1ª vez 1971: enfermedad letal SNC: leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML)
 - Individuos inmunodeprimidos (prevalencia aumentada por el SIDA). 4% VIH mueren por PML

Poliomavirus (Virus emergentes)

- Relación reciente con tumores SNC y colorectales
- Potente inductor de tumores en cerebro de animales de laboratorio
- Infección primaria: infancia y adolescencia temprana
- Normalmente asintomática
- Persistencia en el riñón
- Descritos en otros órganos
- Alto porcentaje de la población seropositiva (crece con la edad; 75%)
- Presencia en marisco
- Estables en aguas y pH ácidos (tracto gastrointestinal posible entrada al organismo)

Poliomavirus (Virus emergentes)

- BK:
 - Personas transplantadas (riñón y médula ósea)
 - Nefropatía, cistitis hemorrágica y estenosis uretérica
 - Infección primaria en infancia
 - Prevalencia alta: 50-90%
 - Presencia en orina
 - Cantidad excretada en función del estado inmunológico
- Presencia en aguas residuales
 - JC; 10^2 - 10^3 partículas/ml
 - BK; 10 - 10^2 partículas/ml
 - 98% + adenovirus humanos (indicadores)

Virus entéricos

Journal of
Applied Microbiology



Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada

Y. Qiu¹, B.E. Lee², N. Neumann^{3,4}, N. Ashbolt³, S. Craik⁵, R. Maal-Bared⁵ and X.L. Pang^{1,4}

¹ Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada

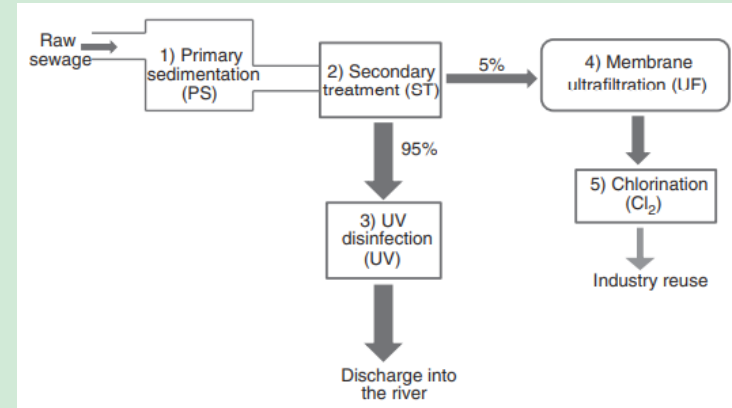


Table 1 Detection and quantification of viruses in wastewater samples after each step of treatment ($n = 16$)

Effluent Virus	PS		ST		UV		UF		Cl ₂	
	Positive, n (%)	Mean $\pm$ SD	Positive, n (%)	Mean $\pm$ SD	Positive, n (%)	Mean $\pm$ SD	Positive, n (%)	Mean $\pm$ SD	Positive, n (%)	Mean $\pm$ SD
RV	16 (100)	5.85 $\pm$ 1.05	16 (100)	4.81 $\pm$ 1.1	16 (100)	4.77 $\pm$ 1.11	4 (25)	3.29 $\pm$ 0.55	6 (38)	2.9 $\pm$ 0.7
NoV	16 (100)	6.01 $\pm$ 0.47	16 (100)	4.45 $\pm$ 0.66	16 (100)	4.37 $\pm$ 0.62	B.D.L	B.D.L	B.D.L	B.D.L
SaV	16 (100)	5.64 $\pm$ 0.67	16 (100)	4.11 $\pm$ 0.86	16 (100)	3.87 $\pm$ 0.82	1 (6)	2.48	2 (13)	2.99 $\pm$ 0.45
AsV	16 (100)	6.33 $\pm$ 0.72	16 (100)	4.53 $\pm$ 0.86	16 (100)	4.53 $\pm$ 1.00	1 (6)	3.24	1 (6)	3.55
EV	16 (100)	4.61 $\pm$ 1.12	11 (69)	2.99 $\pm$ 0.92	10 (63)	2.87 $\pm$ 0.95	B.D.L	B.D.L	B.D.L	B.D.L
AdV	16 (100)	6.96 $\pm$ 0.49	16 (100)	4.85 $\pm$ 0.59	16 (100)	4.94 $\pm$ 0.61	B.D.L	B.D.L	1 (6)	4.27
JCV	16 (100)	5.88 $\pm$ 0.48	16 (100)	3.57 $\pm$ 0.61	16 (100)	3.6 $\pm$ 0.63	B.D.L	B.D.L	B.D.L	B.D.L
ReoV	2 (13)	4.22 $\pm$ 0.21	B.D.L	B.D.L	1 (6)	3.08	1 (6)	3.14	B.D.L	B.D.L

B.D.L, below detection limit; PS, primary sedimentation; ST, secondary treatment; UF, ultrafiltration; Cl₂, chlorine; RV, Rotavirus; NoV, Norovirus; SaV, Sapovirus; AsV, Astrovirus; EV, Enterovirus; AdV, Adenovirus; JCV, JC virus.

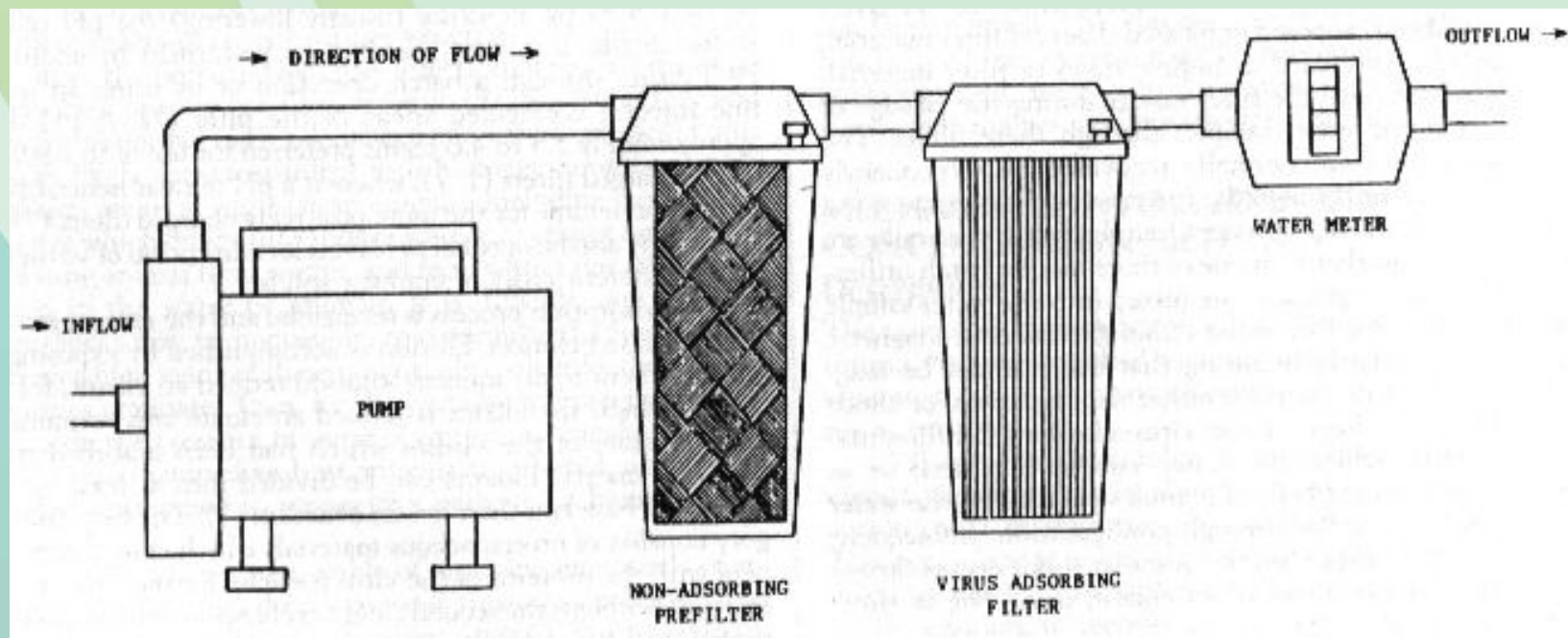
Total 16 samples for each treatment step. The mean was calculated based on the log number of virus concentration (GE copies l⁻¹). Only positive samples were calculated for mean and standard deviation.

- ✓ Alta prevalencia de distintos tipos de virus en agua cruda
- ✓ Diferentes grados de reducción después de los tratamientos
- ✓ Precauciones a la hora de la descarga del efluente

Virus entéricos: Detección

- Bajo nº de partículas víricas en el agua
- Fase de concentración
 - ✓ Aguas superficiales o potables: Filtración mediante filtros cargados
 - ✓ Aguas residuales: ultracentrifugación, floculación orgánica
- Fase de elución
 - ✓ Cambio de cargas de los filtros
- Cuantificación: Cultivos celulares (recuento de calvas)
- Identificación mediante biología celular (PCR o RT-PCR)

Virus entéricos: Detección



Transmisión de patógenos por AARR

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



Escasa supervivencia y
multiplicación de patógenos

Transmisión de patógenos por AARR

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

Características epidemiológicas a tener en cuenta

Patógeno	Resistencia en el medio	Dosis infectiva mínima	Inmunidad	Vías de contaminación	Estados de latencia en el suelo
Virus	Medio	Baja	Corta/Media	Aguas y alimentos	No
Bacterias	Corta/media	Media/alta	Corta/Media	Aguas y alimentos	No
Protozoos	Larga	Baja/Media	Ninguna/Poca	Aguas y alimentos	No
Helmintos	Larga	Baja	Ninguna/Poca	Aguas y alimentos	Si

Características epidemiológicas a tener en cuenta

- Patógenos agrupados según transmisión y propiedades patógenas:

- ✓ Categoría I:

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

- ✓ Categoría II:

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

Características epidemiológicas a tener en cuenta

✓ Categoría III:

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

✓ Categoría IV:

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

✓ Categoría IV:

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

Riesgo para la salud en un plan de reutilización

✓ **RIESGOS REALES EN EL EMPLEO DE AARR**

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

✓ **RIESGO POTENCIAL**

Cuando ocurre:

- a
- a y b
- a,b y c pero no d

Riesgo real es sólo importante cuando existe un exceso medible en la prevalencia o intensidad de la enfermedad

Riesgo para la salud en un plan de reutilización

✓ **INFECCIÓN:** hospedador susceptible y dosis infectante

✓ **FACTORES:**

➤ Período de supervivencia del agente patógeno

✓ Muy variable

✓ Todos los agentes patógenos sobreviven suficientemente para plantear problemas sanitarios

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

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

➤ Modo y frecuencia de aplicación de aguas residuales

✓ Forma de aplicación

✓ Intervalo de aplicación y recolección

Medidas de prevención

- Si el riego es para productos de consumo humano fresco, no fresco, para animales productores implica humectación de las plantas, debe interrumpirse dos semanas antes de la recolección de la cosecha
- En el caso de árboles frutales, la fruta no debe recogerse del suelo
- Extremarse las medidas de higiene en la recolección y en el manejo de los productos en destino
- Riego por goteo es más adecuado para utilizar con agua regenerada
 - ✓ Se recomienda la utilización de dispositivos que disminuyan pérdidas por evaporación, escorrentía e infiltración
 - ✓ Debe minimizarse el riesgo de encharcamiento
 - ✓ La escorrentía superficial debe quedar confinada en el propio terreno
- Riego por aspersión/microaspersión (riesgo de aerosolización):
 - ✓ Riego preferentemente de noche o cuando las instalaciones estén cerradas
 - ✓ Programación del riego para que las plantas dispongan del tiempo suficiente para secarse antes de que los operarios tengan acceso a la zona

Medidas de prevención

- Riego por aspersión/microaspersión (riesgo de aerosolización):
 - ✓ Utilizar aspersores emergentes que permanezcan tapados a nivel del suelo cuando no estén regando
 - ✓ Los aspersores a utilizar deben ser de corto alcance y baja presión (evita que se formen gotas finas o muy finas)
 - ✓ Los aerosoles creados no deben alcanzar de forma permanente a los trabajadores, vías de comunicación asfaltadas o áreas habitadas (obstáculos, pantallas para limitar la propagación)
 - ✓ Los depósitos de agua potable deben estar protegidos de los aerosoles de agua regenerada (directamente o viento)
- Señalización con un color adecuado para las infraestructuras de tratamiento, almacenamiento y distribución del agua regenerada
- Señalización con la leyenda “AGUA REGENERADA NO POTABLE”

Medidas de prevención

- **Prohibido el uso de aguas regeneradas para:**

- Consumo humano, salvo en situaciones catastróficas
- Usos propios de la industria alimentaria excepto para aguas de proceso y limpieza
- Uso en instalaciones hospitalarias
- Para el cultivo de moluscos filtradores en acuicultura
- Uso recreativo como aguas de baño
- Uso en torres de refrigeración y condensadores evaporativos
- Utilización en fuentes y láminas ornamentales en espacios públicos o interiores de edificios públicos
- Cualquier otro uso que las autoridades consideren que conlleva riesgos para la salud o perjuicio para el medio ambiente.

Medidas de prevención

- **Prevención en trabajadores asociados a las AARR:**

- ✓ Deben llevar ropa apropiada durante el trabajo, que sólo se usará durante la jornada laboral (zapatos de seguridad, guantes de trabajo, pantalones, camisa de manga larga)
- ✓ El operario debería ducharse después del trabajo y cambiarse de ropa antes y después del trabajo en un vestidor
- ✓ Llevar siempre guantes desechables durante:
 - ✓ Tareas de limpieza de las distintas etapas de la EDAR
 - ✓ Toma de muestras
 - ✓ Contacto directo con el agua residual/regenerada o lodo
 - ✓ Uso de equipos sucios
- ✓ Desinfectar las manos después de los trabajo con el agua residual/regenerada

Medidas de prevención

- **Prevención en trabajadores asociados a las AARR:**

- ✓ Lavar las manos regularmente con agua, jabón y cepillo, sobre todo antes de comer e ir a casa
- ✓ Utilización de un desinfectante con base alcohólica
- ✓ Cualquier herida debe ser lavada (agua y jabón) y protegida con un vendaje resistentes al agua
- ✓ Vacunación imprescindible (tétanos, hepatitis B, A, difteria..)
- ✓ Debe existir en la instalaciones de la EDAR un botiquín en perfectas condiciones



Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

• Calidad del agua regenerada

I Série — nº 24 «B.O.» da República de Cabo Verde — 2 de março de 2020 605

Quadro 3 – Parâmetros físico-químicos e VMR e VMA para controlo da qualidade das APR e ART destinadas a rega

	VMA		Frequência de amostragem
	Culturas de consumo em cru e para alimentação animal (1) (3)	Culturas ingeridas cozinhadas e para processamento industrial; espaços verdes, florestas e culturas ornamentais (3)	
Ovos de nematodes (2)	1 ovo/10 l	1 ovo/10 l	mensal
Escherichia coli	100 ufc/100 ml	10 000 ufc/100 ml	semanal
Legionella spp.	1 000 ufc/l (4)	100 ufc/l	mensal
Condutividade	3000 µS/cm	3000 µS/cm	semanal
Nitratos	30 mg N-NO ₃ /l	30 mg N-NO ₃ /l	semanal
SST	20 mg/l	35 mg/l	semanal
Turvação	10 UNT	Sem limite	semanal

(1) Irrigação localizada (nenhum contacto da ART com os frutos ou legumes), irrigação de culturas lenhosas, flores ornamentais, plantas de viveiro, estufas sem contacto direto da ART com culturas, irrigação de culturas industriais não-alimentares, pastagens, forrageiras e sementes de produtores de óleos.

(2) Têm que ser considerado, pelo menos, os géneros: *Ancylostoma*, *Trichuris* and *Ascaris*.

(3) No caso de risco de pulverização da água de rega, não pode ser detetado qualquer microrganismo patogénico.

5. A monitorização deve ser realizada à saída da estação de tratamento de águas residuais (ETAR) e em todos os pontos de entrega de águas residuais aos utilizadores. Sempre que o ponto de entrega e o local de reutilização de APR ou ART se distanciem menos de 1 km (um quilómetro), o controle será realizado à saída da estação de tratamento.

Decreto Regulamentar n.º 4/2020

de 2 de março

Considerando que a rega de culturas agrícolas, florestais, ornamentais, viveiros, relvados e outros espaços verdes, consome grandes quantidades de água, cuja qualidade deve ser monitorizada para salvaguarda da saúde pública e animal.

✓ Los conductores de los camiones cisternas deben conocer la clase de agua que transportan (usos permitidos)

✓ Los conductores deben informar a los receptores de la calidad del agua regenerada

Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

- **Requerimientos generales de los camiones y conductores**

- ✓ Formación obligatoria (capacitación sobre el llenado y el uso seguro)
- ✓ Documentación (verificación por parte de la autoridad competente)

- ✓ **Requerimientos para acceder a las EDARs para el llenado**

- ✓ Camiones identificados “agua no potable” y “agua regenerada”
- ✓ Permisos correspondientes
- ✓ Apagar el motor durante el llenado
- ✓ Durante el llenado comprobar que no existan fugas
- ✓ No dejar basura o escombros
- ✓ No bloquear la entrada y salida cuando se espere para llenar o en el llenado

- ✓ **Requisitos/precauciones de manejo y uso del agua regenerada**

- ✓ No llenar demasiado las cisternas
- ✓ No beber agua regenerada ni utilizarla para la preparación de alimentos
- ✓ Los conductores y usuarios deben lavarse las manos con agua y jabón y aplicarse desinfectante después de contactar con el agua regenerada

Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

✓ **Requisitos/precauciones de manejo y uso del agua regenerada**

- ✓ Utilización de guantes y gafas protectoras
- ✓ Tomar precauciones para que los alimentos no entre en contacto con el agua
- ✓ El camión debe estar equipado con botiquín de primeros auxilios
- ✓ El camión debe llevar un libro de registro
 - ✓ Volumen de agua recogida
 - ✓ Fecha y EDAR de recogida
 - ✓ Fecha de entrega/uso
 - ✓ Volumen de agua suministrada/utilizada
 - ✓ Uso previsto del agua
 - ✓ Nombre y dirección del destinatario
- ✓ No se permitirá que el agua se vierta en fuentes de agua potable
- ✓ Aplicación de medidas para evitar la pulverización excesiva, encharcamiento
- ✓ No regar o almacenar agua regenerada cerca de un pozo de agua potable (16 m)

Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

✓ **Requisitos/precauciones de manejo y uso del agua regenerada**

- ✓ Los vehículos para el transporte deben ser inspeccionados antes de cada uso
- ✓ Una cisterna que haya transportado material de un pozo séptico no puede transporta agua regenerada
- ✓ Los camiones que transporten agua regenerada nunca podrán transportar agua potable
- ✓ Las mangueras utilizadas para el llenado y vaciado del camión deben ser extraíbles y almacenarse desconectadas (inspección antes del uso)
- ✓ Etiquetar depósitos, grifos...en contacto con el agua regenerada
- ✓ Revisión periódica por parte del autoridad competente

✓ **Desinfección de las cisternas**

- ✓ Cuando se quiera transportar agua regenerada de mayor calidad que la anterior
- ✓ Cuando el camión cisterna desprenda malos olores

Recomendaciones para la distribución de agua regenerada en camiones cisterna

✓ **Desinfección de las cisternas**

- ✓ Cuando se quiera transportar agua regenerada de mejor calidad que la anterior
- ✓ Cuando el camión cisterna desprenda malos olores
- ✓ Cuando exista recrecimiento de microorganismos o crecimiento excesivo de biopelícula
- ✓ Cuando exista evidencia de la acumulación de sólidos en el camión cisterna
- ✓ Cuando se realice una limpieza general

✓ Tener en cuenta:

- ✓ Utilizar un desinfectante adecuado
- ✓ Hipoclorito de sodio o de calcio
- ✓ Asegurarse que la mezcla desinfectante sea activa para inactivar/matar los patógenos
- ✓ Retirar los sólidos de la cisterna antes de desinfectarlo (eficacia adecuada)

Vigilancia en AARR como sistema de alerta temprana SARS-CoV-2

• **Presencia de SARS-CoV-2 en heces**

- ✓ La vigilancia de AARR como sistema de alerta temprana se puede hacer debido a la presencia confirmada en heces
- ✓ La presencia del ARN viral se prolonga en muestras fecales durante un periodo superior al de muestras respiratorias (media de 27,9 días desde la aparición del primer síntoma en heces/ 11,2 días más que para las respiratorias)
- ✓ Replicación activa del virus en el tracto gastrointestinal.
- ✓ Transmisión fecal-oral después de la desaparición del virus del tracto respiratorio
- ✓ No se ha informado sobre casos de transmisión fecal-oral
- ✓ Improbable la transmisión por esta vía
- ✓ Se requiere más información

Vigilancia en AARR como sistema de alerta temprana SARS-CoV-2

• **Infectividad de SARS-CoV-2 en heces**

- ✓ La infectividad disminuye rápidamente en tracto gastrointestinal
- ✓ La presencia de SARS-CoV-2 infeccioso indica la posibilidad de transmisión fecal-oral o fecal-respiratoria
- ✓ La proporción de SARS-CoV-2 infeccioso en secreciones respiratorias es muy baja (1 unidad/ 10^7 partículas), aún menor en heces
- ✓ El virus puede establecer una infección y replicación en las células epiteliales del intestino/inactivado por los fluidos del colon
- ✓ El virus disminuye hasta 5 veces en 1 hora, pocos virus infecciosos al cabo de 24 horas
- ✓ Sin embargo: precauciones apropiadas para evitar la potencial transmisión a partir de heces

Vigilancia en AARR como sistema de alerta temprana SARS-CoV-2

EMERGING INFECTIOUS DISEASES®

EID Journal > Volume 26 > Early Release > Main Article

Disclaimer: Early release articles are not considered as final versions. Any changes will be reflected in the online version in the month the article is official.

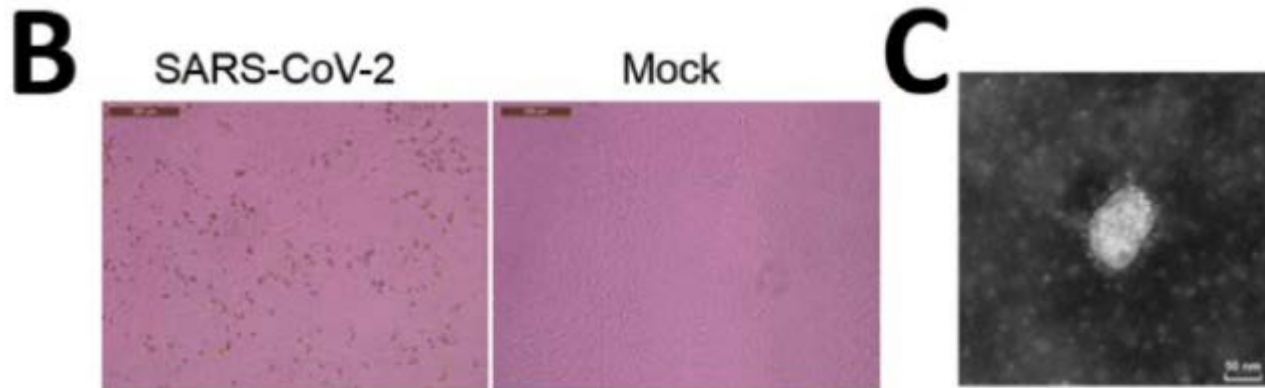
Volume 26, Number 8—August 2020

Research Letter

Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19

Fei Xiao¹, Jing Sun¹, Yonghao Xu¹, Fang Li¹, Xiaofang Huang¹, Heying Li, Jingxian Zhao, Jicheng Huang, and Jincun Zhao²

Author affiliations: Sun Yat-sen University, Zhuhai, China (F. Xiao); Guangzhou Medical University, Guangzhou, China (J. Sun, Y. Xu, F. Li, X. Huang, Jingxian Zhao, Jincun Zhao); Chinese Academy of Sciences, Guangzhou (H. Li); Guangzhou Customs District Technology Center, Guangzhou (J. Huang)



B) Vero E6 cells infected with SARS-CoV-2 isolate for 72 hours. C) Detection of viral particles by using transmission electron microscopy (original magnification, $\times 98,000$).

Vigilancia en AARR como sistema de alerta temprana SARS-CoV-2

• **Persistencia de SARS-CoV-2 en AARR**

✓ Holanda:

- ✓ Se detectó SARS-CoV-2 en AARR antes del conocimiento de primer caso de COVID-19
- ✓ Explicación: excreción del virus por individuos potencialmente sintomáticos, asintomáticos o presintomático
- ✓ La detección de virus en AARR (incluso con baja prevalencia de COVID-19)

✓ España:

- ✓ Investigación de la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en 6 EDARs. Zona de baja prevalencia de COVID-19 (Murcia)
 - ✓ Se detectó SARS-CoV-2 eliminado por las heces antes de que se informara de los primeros casos
- ✓ Detección del SARS-CoV-2 en AARR en las primeras etapas de la propagación de COVID-19 : VIGILANCIA DE LAS AARR ES UNA ESTRATEGIA COMO INDICADOR TEMPRANO DE LA INFECCIÓN DENTRO DE UNA POBLACIÓN (medidas para evitar brotes)

Vigilancia en AARR como sistema de alerta temprana SARS-CoV-2

- Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *medRxiv*. 2020.03.29.20045880
- Lodder W, de Roda Husman AM. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2020;5(6):533-4.

Water Research 181 (2020) 115942

Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

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



SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area

Walter Randazzo ^{a,b}, Pilar Truchado ^c, Enric Cuevas-Ferrando ^b, Pedro Simón ^d, Ana Allende ^c, Gloria Sánchez ^{b,*}

^a Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Av. Dr. Moliner, 50, Burjassot, 46100, Valencia, Spain

^b Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institute of Agrochemistry and Food Technology, IATA-CSIC, Av. Agustín Escardino 7, Paterna, 46100, Valencia, Spain

^c Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100, Murcia, Spain

^d ESAMER, Avenida Juan Carlos, s/n - Edificio Torre Jomea, Murcia, Spain



Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases

Gemma Chavarria-Miró, Eduard Anfruns-Estrada, Susana Guiu, Miquel Paraira, Belén Galofré, Gloria Sánchez, Rosa Pintó, Albert Bosch

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.13.20129627>

medRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR HEALTH SCIENCES



Vigilancia en AARR como sistema de alerta temprana SARS-CoV-2

- Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *medRxiv*. 2020.03.29.20045880
- Lodder W, de Roda Husman AM. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2020;5(6):533-4.

Water Research 181 (2020) 115942

Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

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



SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area

Walter Randazzo ^{a,b}, Pilar Truchado ^c, Enric Cuevas-Ferrando ^b, Pedro Simón ^d, Ana Allende ^c, Gloria Sánchez ^{b,*}

^a Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Av. Dr. Moliner, 50, Burjassot, 46100, Valencia, Spain

^b Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institute of Agrochemistry and Food Technology, IATA-CSIC, Av. Agustín Escardino 7, Paterna, 46100, Valencia, Spain

^c Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100, Murcia, Spain

^d ESAMER, Avenida Juan Carlos, s/n - Edificio Torre Jomea, Murcia, Spain



Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases

Gemma Chavarria-Miró, Eduard Anfruns-Estrada, Susana Guiu, Miquel Paraira, Belén Galofré, Gloria Sánchez, Rosa Pintó, Albert Bosch

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.13.20129627>

medRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR HEALTH SCIENCES



Parceiros Canárias



Parceiros Madeira



ARM - Águas e Resíduos da Madeira, S.A.



Parceiros Cabo Verde



**Ministério
da Educação**

Direção Nacional de Educação



**Ministério da Agricultura
e Ambiente**

Direção Nacional do Ambiente



**Ministério da Agricultura
e Ambiente**

Direção Geral da Agricultura,
Silvicultura e Pecuária

Participante Associado



ADAPTRES

