



# REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

[www.elsevier.es/ram](http://www.elsevier.es/ram)



ORIGINAL

## Parásitos humanos en aguas superficiales de uso recreativo en Salta, Argentina

Diego G. Sanguino-Jorquera<sup>a,b</sup>, Hugo R. Poma<sup>a</sup>, Verónica B. Rajal<sup>a,c,d,\*</sup>,  
María M. Juárez<sup>a</sup> y Verónica P. Irazusta<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI), Universidad Nacional de Salta – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Salta, Salta, Argentina

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta, Salta, Argentina

<sup>c</sup> Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta, Salta, Salta, Argentina

<sup>d</sup> Singapore Centre for Environmental Life Sciences Engineering (SCELSE), Nanyang Technological University, Singapur, Singapur

Recibido el 15 de mayo de 2023; aceptado el 2 de noviembre de 2023

### PALABRAS CLAVE

Agua superficial;  
Arroyo;  
Agua termal;  
Parásitos;  
*Acanthamoeba*

**Resumen** Las enfermedades transmitidas por el agua pueden tener diferente origen; las bacterias y los parásitos son los agentes causales más importantes. En este trabajo se monitorearon muestras de agua en tres puntos próximos a una zona recreativa en la provincia de Salta (Argentina): dos en un arroyo que rodea a un complejo termal, aguas arriba y aguas abajo de donde descargan las aguas de dicho complejo; el tercero, en la zona de salida del agua proveniente del complejo. Las muestras se tomaron en cuatro meses del año. Se realizó la caracterización fisicoquímica, bacteriológica y búsqueda de parásitos y amebas de vida libre (AVL) del agua en cada punto. Las muestras de agua a la salida del complejo termal presentaron características fisicoquímicas diferentes a las del arroyo. En todos los puntos se detectaron indicadores bacterianos de contaminación, pero el agua del arroyo tuvo una concentración significativamente mayor de *Pseudomonas* sp. En las muestras del arroyo se encontraron, esporádicamente, huevos de *Ascaris* spp., quistes de *Giardia* sp. y huevos de ancilostomídeos. En todas las muestras se encontraron AVL; se aislaron 15 AVL, que se identificaron como *Acanthamoeba* sp., mayoritariamente pertenecientes al genotipo T4. La vigilancia de parásitos en ambientes acuáticos de uso recreativo es un complemento importante a la de los indicadores microbiológicos tradicionales para la evaluación de la calidad del agua. Los parásitos identificados representan un potencial riesgo para la salud de las personas que hacen uso de dichos ambientes.

© 2023 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

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

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.11.001>

0325-7541/© 2023 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: D.G. Sanguino-Jorquera, H.R. Poma, V.B. Rajal et al., Parásitos humanos en aguas superficiales de uso recreativo en Salta, Argentina, Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.11.001>

## KEYWORDS

Surface water;  
Creek;  
Thermal water;  
Parasites;  
*Acanthamoeba*

## Human parasites in surface water used for recreation in Salta, Argentina

**Abstract** Waterborne diseases can have different origins, micro-organisms such as bacteria and parasites being the most important ones. In this study, two recreational aquatic environments were studied in the province of Salta, Argentina. Water samples collected from three different locations, two from a creek and one from the outlet of a thermal complex, were monitored at four time points. Physicochemical and microbiological characterization of each point was conducted, as well as a search for parasites and amebae. Parasites were identified through optical microscopy observations and free-living amebae (FLA) were isolated by spiking in Petri dishes followed by subsequent molecular identification. Water samples from the outlet of the thermal complex showed different physicochemical characteristics from those of the creek. Bacterial indicators of contamination were detected at all points; however, the creek water had a significantly higher concentration of *Pseudomonas* sp. Sporadically, creek samples exhibited *Ascaris* spp. eggs, *Giardia* sp. cysts, and ancylostomid eggs. The presence of FLA was observed in all samples, 15 of which were isolated and identified as *Acanthamoeba* sp., mostly belonging to the T4 genotype. Parasite surveillance in recreational aquatic environments is an important complement to traditional microbial indicators for assessing water quality. The identified parasites represent a potential health risk for people using these environments.

© 2023 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

Las enfermedades de transmisión hídrica ocasionadas por microorganismos representan una problemática en la salud del hombre<sup>28</sup>. Los estándares de calidad de agua, en su mayoría, comprenden la detección y la cuantificación de un grupo de bacterias indicadoras de contaminación fecal. De acuerdo al uso previsto del recurso, los valores máximos admisibles de este grupo de bacterias difieren<sup>11</sup>. En países como Estados Unidos o Canadá, los estándares de calidad también tienen en consideración la presencia de parásitos, como *Cryptosporidium* y *Giardia*<sup>14,34</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre los diferentes parásitos causales de enfermedades transmitidas por el agua se destacan los parásitos gastrointestinales como *Cryptosporidium*, algunos helmintos y algunas especies de amebas de vida libre (AVL)<sup>36</sup>. Estas últimas son un grupo de protozoos cosmopolitas de vida libre, que comprende un pequeño número de especies con potencial de ocasionar enfermedades en el hombre, con daños en el sistema nervioso central, la dermis o los ojos<sup>17</sup>. Entre las AVL patógenas, los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Naegleria* son los más relevantes debido a la gravedad de los casos clínicos reportados<sup>17</sup>. Cuando *Balamuthia* y *Naegleria* son diagnosticadas tardíamente, pueden causar daños letales en sus hospedadores, mientras que *Acanthamoeba*, de acuerdo al genotipo, está asociada a tres enfermedades: queratitis amebiana, encefalitis granulomatosa amebiana y acantamebiasis cutánea<sup>30</sup>.

El uso que se hace de los ambientes acuáticos es variado y las actividades recreativas cobran gran importancia. Los ríos, por ejemplo, tanto en zonas urbanas como en zonas rurales, se utilizan para actividades recreativas, incluidas las de baño, pesca y esparcimiento en general, sobre todo durante los meses cálidos del año<sup>5</sup>. El agua termal surgente

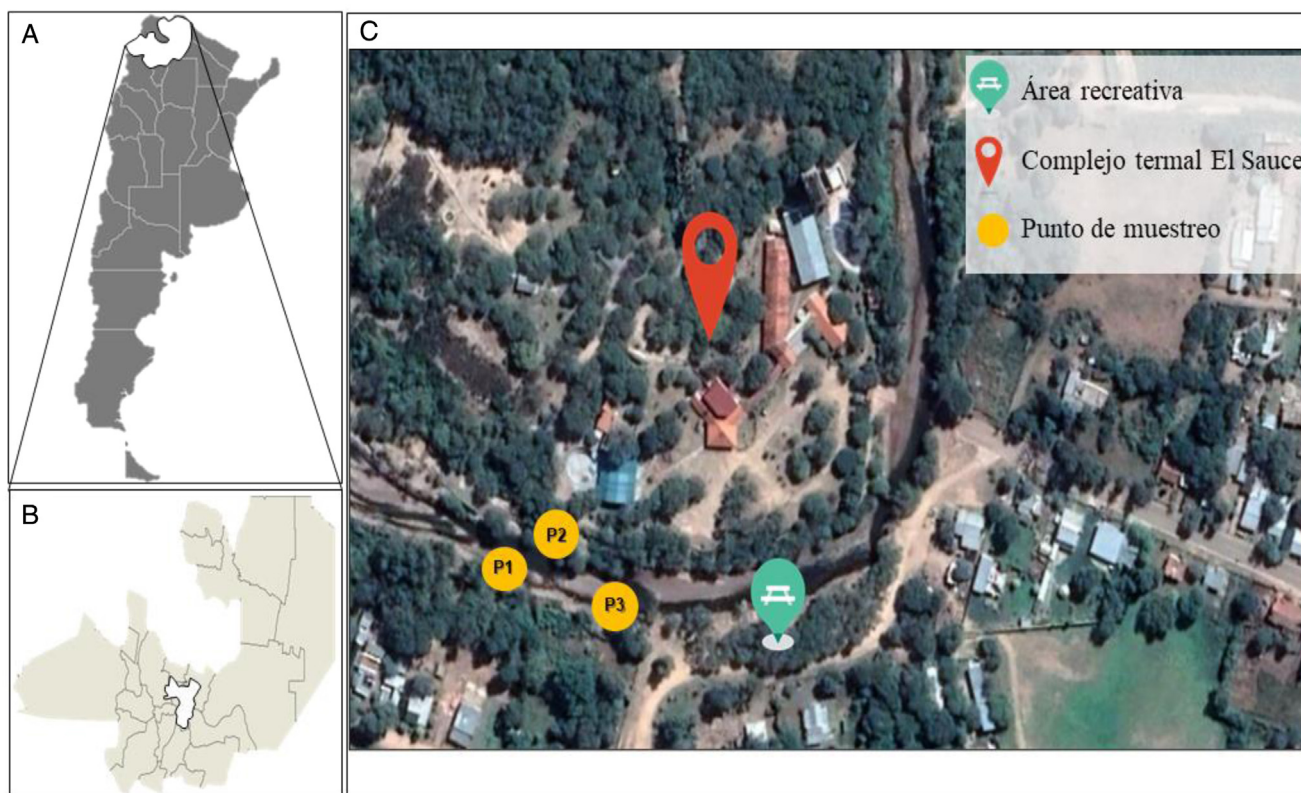
representa otra opción de recreación, y, por su temperatura, puede ser utilizada durante todo el año; sin embargo, suele encontrarse en complejos privados. Ambos tipos de ambientes pueden ser vehículos de transmisión de parásitos capaces de comprometer la salud de las personas<sup>4,16</sup>.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad físico-química, bacteriológica y parasitológica del agua en dos ambientes acuáticos en la provincia de Salta: 1) a la salida de un complejo termal surgente, y 2) en el arroyo donde se descarga el agua de dicho complejo (por fuera de aquel), tomando las muestras aguas arriba y aguas abajo respecto de la zona de descarga. Además, se planteó específicamente buscar e identificar AVL del género *Acanthamoeba*.

## Materiales y métodos

### Área de estudio y muestreo

Las muestras se tomaron en la periferia de un complejo de aguas termales en el paraje El Sauce (municipio El Bordo, Departamento de General Martín Miguel de Güemes), provincia de Salta, Argentina. Dicho complejo se encuentra en una zona rural, con un promedio de 22,5 habitantes/km<sup>2</sup>. Se seleccionaron tres puntos de muestreo externos al complejo termal: dos sobre el arroyo El Sauce, que rodea al complejo, con una distancia de separación entre ellos de 20 m (en adelante, P1 y P3); el otro punto correspondió al agua de salida del complejo termal (en adelante, P2), que desemboca en ese mismo arroyo (fig. 1). Los puntos P1 y P3 presentan actividad recreativa al aire libre por parte de los habitantes del lugar, mientras que el agua en P2 solo proviene del complejo termal, de reconocida actividad recreativa turística. En cada punto se realizaron cuatro campañas de muestreo en los meses de septiembre (M1), octubre (M2) y noviembre (M3) de 2017 y en febrero (M4) de 2018.



**Figura 1** Ubicación del área de estudio. A) Provincia de Salta, en Argentina. B) Departamento de General Martín Miguel de Güemes, en Salta. C) Paraje El Sauce, en el municipio El Bordo, Departamento de General Martín Miguel de Güemes. Los círculos amarillos representan los puntos de muestreo sobre el arroyo El Sauce (P1 y P3) y a la salida del complejo termal (P2).

### Caracterización fisicoquímica y bacteriológica

En los puntos de muestreo se midió la temperatura (T, en °C), la conductividad (COND, en mS/cm), la turbidez (TURB, en NTU) y el pH, utilizando el equipo multiparamétrico Horiba U-10. Para la caracterización microbiológica se tomaron muestras de 1 litro de agua en botellas de vidrio estériles, las cuales se llevaron refrigeradas al laboratorio para su procesamiento. Por un lado, se usó filtración por membrana y posterior siembra en placas para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias en 100 ml (UFC/100 ml) de los siguientes grupos o microorganismos: a) aerobios mesófilos totales (AEM), en agar recuento en placa (Britania, Argentina); b) *Pseudomonas* sp. (PSE), en agar cetrímide (Britania, Argentina)<sup>8</sup>; c) enterococos (ENT), en agar *m-Enterococcus* (Difco)-agar hierro esculina<sup>33</sup>, y d) *Escherichia coli* (ECO), en agar mTec (Fluka)<sup>35</sup>. Por otro lado, para estimar la concentración en términos del número más probable en 100 ml (NMP/100 ml) de coliformes totales y coliformes termotolerantes (CTO y CTT, respectivamente), se utilizó la metodología de tubos múltiples en caldo de cultivo MacConkey (Britania, Argentina)<sup>8</sup>.

### Caracterización parasitológica

Las muestras de agua se concentraron utilizando un sistema de ultrafiltración<sup>18</sup>. De manera sintética, para cada muestra se concentraron 40 litros de agua utilizando un módulo

de fibra hueca descartable para hemodiálisis, Polyflux® 24R (Gambro), con su posterior elución empleando una solución de Tween 80 al 0,1% (v/v) y glicina 0,05 M (pH 7)<sup>24</sup>; el volumen del concentrado final fue de 60-135 ml.

Para posteriores análisis se tomaron alícuotas de 1 ml de cada concentrado final y se les agregó un volumen igual de solución de formol al 10% (v/v) para preservar y mantener las estructuras de los elementos parasitarios. La caracterización parasitológica se realizó mediante observaciones directas bajo microscopía óptica de luz (Nikon, Eclipse E200) a 400× y a 1.000× en cámara de Neubauer modificada, con la adición de solución de Lugol para la distinción de estructuras internas.

### Aislamiento de AVL

Se prepararon placas de agar no nutritivo (ANN) al 1,5% (p/v) de agar (Britania), cubiertas con 100 µl de una suspensión de *Escherichia coli* inactivada por calor<sup>21</sup>. Para el aislamiento de AVL, se esparció una alícuota de 300 µl de cada concentrado de ultrafiltración sobre una placa de ANN, que fue incubada a 30 °C. Del mismo modo, otra alícuota de igual volumen se esparció en otra placa de ANN, que fue incubada a 42 °C para favorecer el crecimiento de AVL termotolerantes<sup>21</sup>. En ambos casos, el tiempo de incubación fue de 10 días, con observación regular de las placas para determinar presencia de formas vegetativas o de resistencia de AVL. Una vez detectada la presencia de amebas en las

placas, se seleccionó una zona con abundante crecimiento y, en condición de esterilidad, se cortó la zona seleccionada. Esta última se colocó de manera invertida en otra placa con ANN bajo las mismas condiciones de temperatura previamente descritas, con el fin de obtener cultivos puros de amebas.

### Detección de *Acanthamoeba* spp.

A partir de los cultivos puros de AVL se realizó la extracción del material genético total utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los cebadores JDP1 directo (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') y JDP2 reverso (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3') para amplificar una región del ARNr 18S específica de *Acanthamoeba* spp.<sup>12</sup>. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Las reacciones se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems®). La mezcla de reacción tuvo un volumen final por muestra de 35 µl: 7 µl de muestra de ADN, *buffer* A Taq 1X (Kapa, Biosystems), 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cebador directo, 0,4 µM de cebador reverso, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, ADN polimerasa Taq 1X (Kapa, Biosystems) y agua libre de ADN hasta completar el volumen. La amplificación de ADN se reveló por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) preparado en solución TAE 1X (tris-ácido acético-EDTA) y teñido con el colorante Syber Safe (Invitrogen). Las muestras se sembraron en paralelo con el marcador de peso molecular MiMarket B042-50 (Biodynamics) y posteriormente se observaron en transiluminador UV (Labnet U1000-230).

### Identificación molecular

Los productos de amplificación de las PCR positivas para el género *Acanthamoeba* fueron secuenciados empleando la metodología de Sanger en MacroGen® (Seúl, Corea). Luego, las secuencias se editaron usando el programa Chromas lite v2.1.1 y se alinearon con aquellas provenientes de la base de datos GenBank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), con el programa MEGA v11. Las secuencias nucleotídicas de cada aislado fueron cargadas a la base de datos del GenBank. Finalmente, se infirieron las relaciones filogenéticas usando el método de Neighbor-Joining, MEGA v11. Las distancias evolutivas se calcularon con la metodología de Maximum Composite Likelihood. Para validar estadísticamente el árbol construido se realizó la prueba de *bootstrap* con 1.000 réplicas; el porcentaje de árboles replicados en los que los aislados fueron agrupados se muestran junto a las ramas<sup>31</sup>.

### Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Infostat versión 2017, con un nivel de significancia menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Debido a que los datos no

presentaron una distribución normal, se emplearon estadísticos no paramétricos. La variabilidad de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos entre puntos de muestreo se evaluó usando el test de Wilcoxon (U de Mann-Whitney) para muestras pareadas. A su vez, el estadístico Kruskal-Wallis se usó para observar la variabilidad entre muestreos y para cada punto.

## Resultados

### Caracterización fisicoquímica y bacteriológica

Los parámetros fisicoquímicos del agua proveniente del complejo termal se diferenciaron de los del arroyo (tabla 1). Tal es el caso de la temperatura, que en P2 fue 10 °C más alta con respecto a los otros dos puntos de muestreo. Los puntos ubicados sobre el arroyo (P1 y P3) no mostraron diferencias significativas entre sí para ninguno de los parámetros fisicoquímicos medidos, evidenciando que la descarga del agua del complejo termal no tiene un impacto en la calidad del agua del arroyo. Sin embargo, la comparación de a pares entre los puntos P1-P2 y P2-P3 mostró diferencias significativas en cuanto a conductividad y temperatura.

Con respecto a los valores extremos, los pH máximos se registraron en noviembre y los mínimos en febrero: 8,19/5,81, 7,60/6,49 y 8,13/5,92 para P1, P2 y P3, respectivamente. Asimismo, en noviembre se detectó la menor turbidez en todos los puntos (NTU: 0, 0 y 2). Los valores máximos de conductividad en P1 y P3 (1,78 y 2,73 mS/cm) se encontraron en noviembre. En P2, el valor máximo de conductividad se registró en febrero, y el mínimo, en octubre (15,70 y 14 mS/cm, respectivamente).

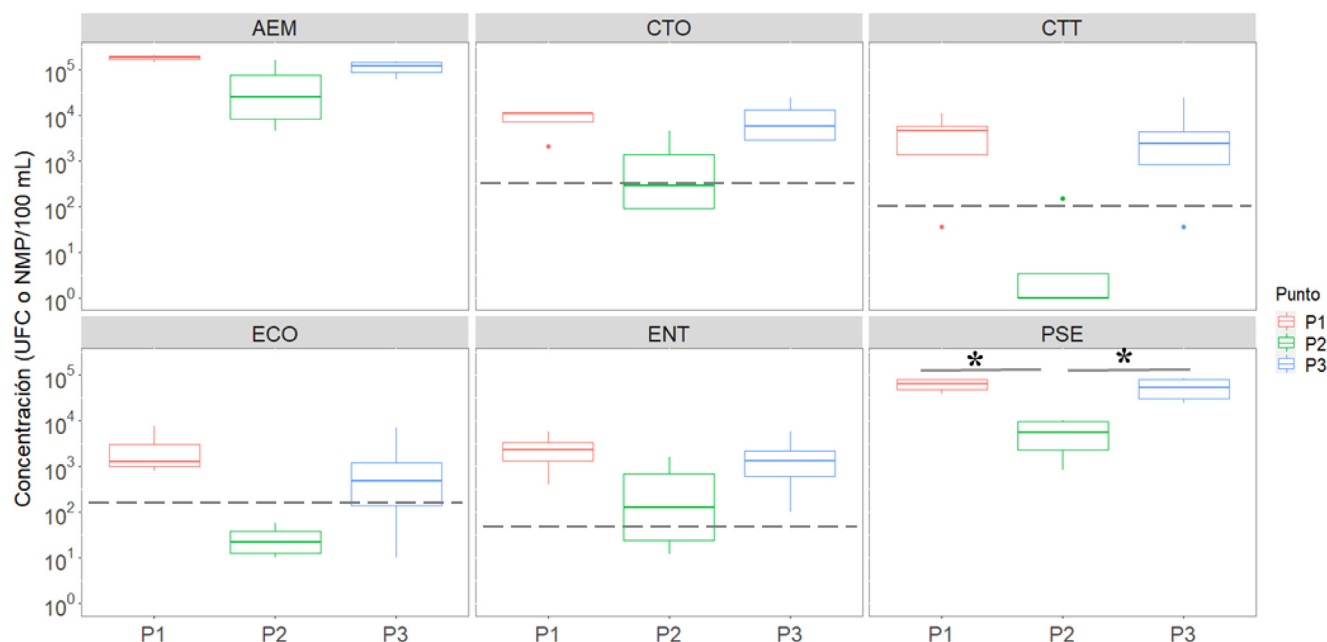
En la figura 2 se presentan los hallazgos microbiológicos. La concentración media de microorganismos aerobios mesófilos (AEM) totales en P1 y P3 (puntos sobre arroyo El Sauce) fue superior a  $1,0 \times 10^5$  UFC/100 ml, casi un orden de magnitud mayor que la de P2, que fue de  $5,82 \times 10^4$  UFC/100 ml y la que presentó mayor variabilidad. En todos los puntos de muestreo se detectó la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal: los enterococos (ENT) superaron el límite aceptable para ambientes acuáticos recreativos de 71 UFC/100 ml<sup>34</sup> en todos los puntos de monitoreo y en la mayoría de las campañas de muestreo. También la concentración de coliformes totales (CTO) superó el límite establecido de 500 NMP/100 ml<sup>9</sup> en todos los puntos de muestreo en la mayoría de las campañas de monitoreo, excepto en P1 en M3, donde no se detectaron coliformes. Asimismo, la concentración de coliformes termotolerantes (CTT) superó los 100 NMP/100 ml<sup>9</sup> en todos los puntos y todas las campañas, a excepción de P2 en M2 y M4. La concentración límite aceptable de 235 UFC de *E. coli*/100 ml<sup>34</sup> (ECO) se superó en los puntos sobre el arroyo (P1 y P3) en todas las campañas. En la comparación de a pares entre los puntos P1-P2 y P2-P3 se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de *Pseudomonas* sp. (PSE). Ninguna otra variable bacteriológica presentó diferencias significativas entre los puntos de muestreo. Además, las concentraciones de los microorganismos, para cada punto, no presentaron cambios significativos en los distintos momentos de monitoreo.

**Tabla 1** Variables fisicoquímicas

Variable	Media ± DE			Valor de p		
	P1	P2	P3	P1-P2	P2-P3	P1-P3
Temperatura (°C)	21,52 ± 2,61	32,90 ± 0,40	21,52 ± 2,91	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	> 0,99
Conductividad (mS/cm)	1,11 ± 0,53	14,32 ± 0,95	1,23 ± 0,96	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	> 0,99
Turbidez (NTU)	8,00 ± 9,80	1,00 ± 2,00	10,25 ± 8,65	0,43	0,08	0,51
pH	7,15 ± 1,05	7,10 ± 0,50	7,20 ± 0,96	0,88	0,68	> 0,99

DE: desviación estándar.

Valores de  $p < 0,05$  según el test de Wilcoxon se consideraron significativos (resaltados en **negrita**).



**Figura 2** Caracterización microbiológica del agua. Aerobios mesófilos totales (AEM), coliformes totales (CTO), coliformes termo-tolerantes (CTT), *Escherichia coli* (ECO), enterococos (ENT), *Pseudomonas* sp. (PSE).

\* Valores de  $p < 0,05$  según el test de Wilcoxon se consideraron significativos. Las líneas punteadas representan los máximos permitidos: ENT, 71 UFC/100 ml; ECO, 235 UFC/100 ml<sup>30,32</sup>; CTO, 500 NMP/100 ml y CTT, 100 NMP/100 ml<sup>8</sup>.

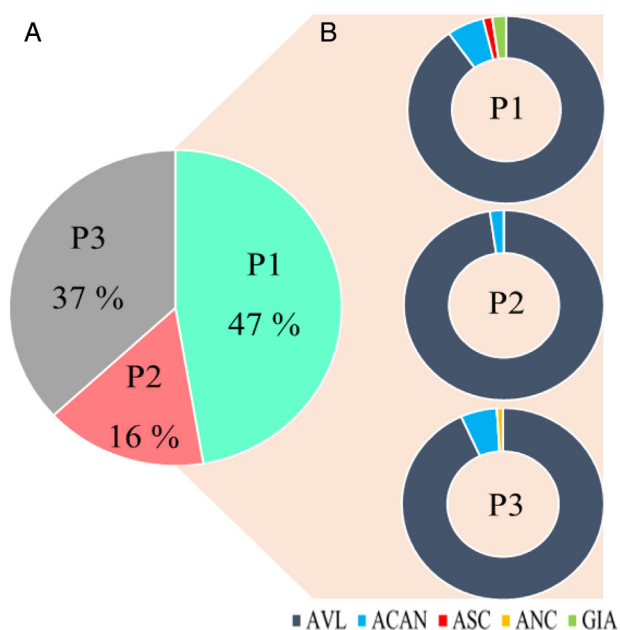
### Caracterización parasitológica y aislamiento de AVL

En todos los puntos de muestreo se detectó al menos un elemento parasitario correspondiente a protozooario o helminto (fig. 3). El mayor porcentaje de elementos parasitarios se detectó en el punto P1, seguido de P3 y P2 (fig. 3A). En todos los puntos, los elementos parasitarios con mayor frecuencia relativa porcentual fueron las AVL: más del 90% (fig. 3B). En el agua de salida del complejo termal, las AVL fueron la única forma parasitaria encontrada, y el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en medio ANN se logró a partir de una única muestra. Además, solo se encontraron parásitos diferentes de protozoos amebianos en los puntos sobre el arroyo El Sauce. La presencia de *Ascaris* spp. (ASC) y *Giardia* sp. (GIA) en P1 fue esporádica, con una frecuencia relativa del 1,5% y del 2,2%, respectivamente. De igual manera, solo en uno de los cuatro muestreos se detectó la presencia de huevos de ancilostomídeos (ANC) en P3 (fig. 3B).

Cuando la condición de incubación fue de 30 °C, en todos los sitios se logró el aislamiento de AVL cultivables en ANN en

al menos una muestra, pero no se observó crecimiento amebiano cuando la temperatura de incubación fue de 42 °C. Únicamente en el punto P3 se aislaron AVL en las cuatro campañas de monitoreo (M1, M2, M3 y M4), el cual aportó 12 aislados (fig. 4). En P1 se aislaron AVL en las campañas M3 y M4 (5 aislados en cada campaña, 10 en total) y en P2 solo se aislaron AVL en M3 en dos ocasiones, lo que sumó 2 aislados. De esta manera, se reunió un total de 24 aislados de AVL. De ellos, 15 (62,5%) fueron identificados como *Acanthamoeba* spp.: 8 se obtuvieron del sitio P1, 6 del sitio P3 y solo uno del sitio P2 (fig. 4). El mayor número de aislamientos, tanto de AVL como de *Acanthamoeba* spp., se obtuvo en las dos últimas campañas de muestreo, M3 y M4 (fig. 4).

El análisis de las secuencias de ADN mostró una relación mayoritaria con el genotipo T4 (11/15; 73,3%), de las cuales 9 se encuentran estrechamente relacionadas entre sí (fig. 5). La secuencia del único aislado correspondiente al punto P2 se encuentra estrechamente relacionada con la de un aislado del punto P1. Por otro lado, es notorio



**Figura 3** A) Porcentaje de elementos parasitarios detectados. B) Frecuencia relativa porcentual de cada especie identificada en cada punto considerando las cuatro campañas de muestreo. AVL: amebas de vida libre; ACAN: *Acanthamoeba* spp.; ASC: *Ascaris* spp.; ANC: ancilostomideo; GIA: *Giardia* sp.

que la secuencia del aislado obtenido en M1 se aleja filogenéticamente del resto de las secuencias. Las secuencias MN071400, MN071408, MN071410 y MN071412 se encontraron alejadas del genotipo T4. De estos últimos, MN071412 se encontró próximo al genotipo T2, mientras que MN071408 y MN071410 no mostraron una relación filogenética concluyente.

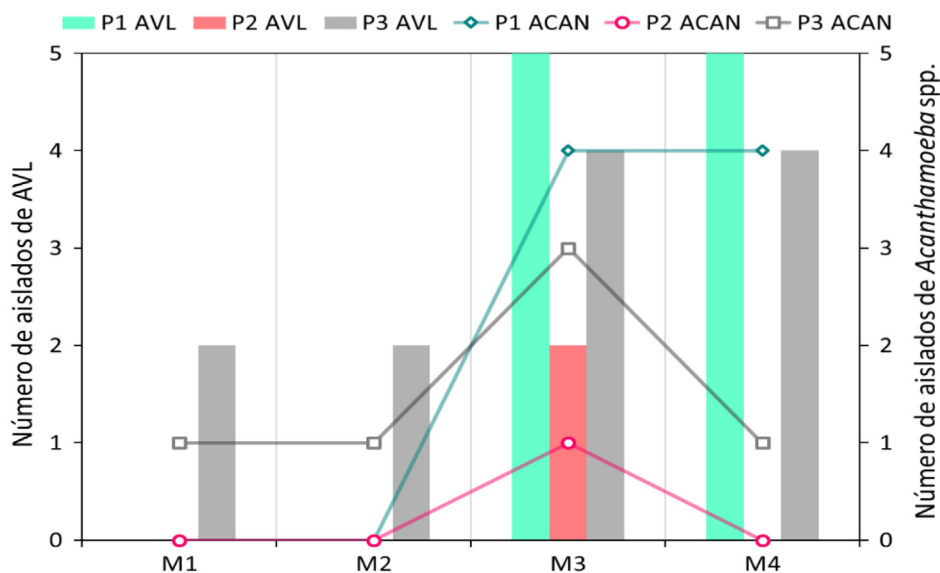
## Discusión

La mayoría de los estudios parasitológicos ambientales están enfocados en la búsqueda de patógenos, sin otorgar suficiente importancia a su entorno. Este incluye las variables fisicoquímicas, meteorológicas, socioeconómicas, entre otras, que podrían favorecer su prevalencia<sup>6,26</sup>.

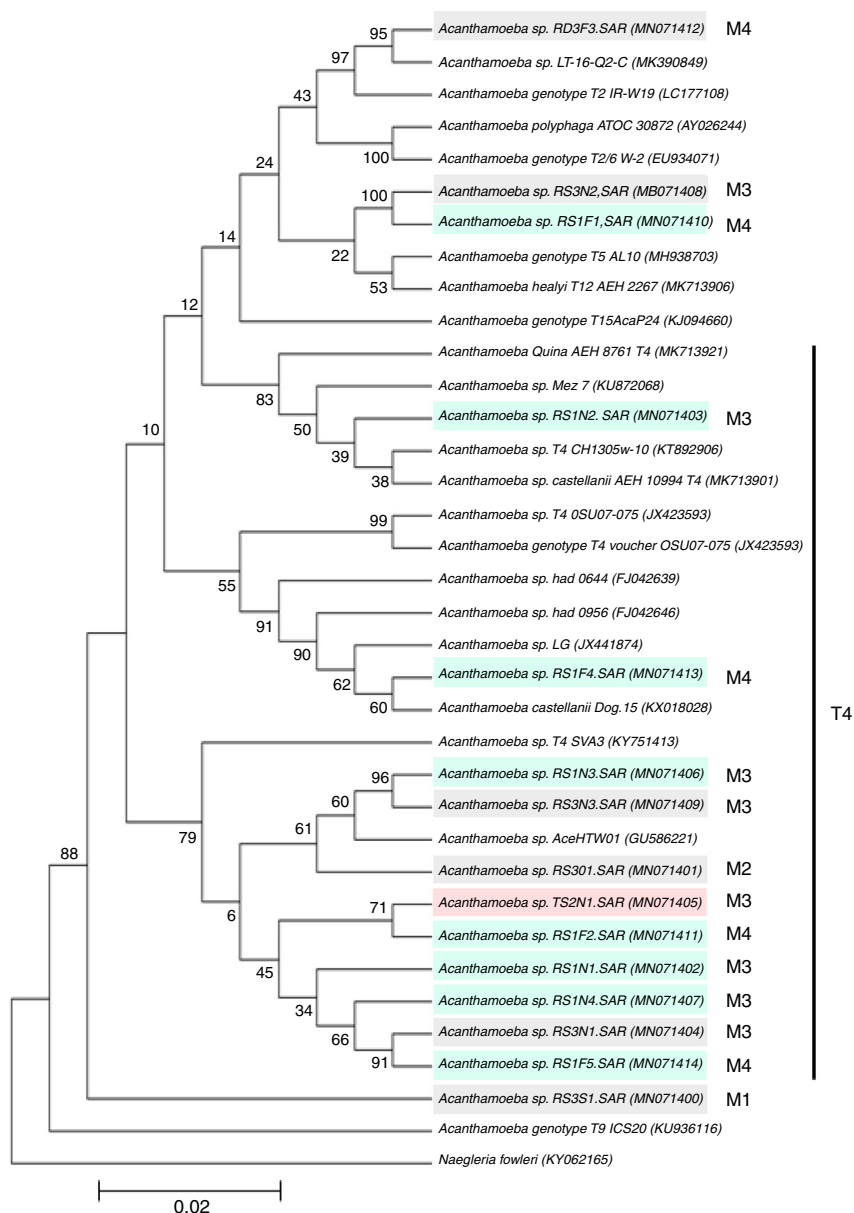
En este trabajo observamos características fisicoquímicas diferentes entre el agua proveniente del complejo termal y el agua del arroyo, propias del origen de cada ambiente acuático. La elevada temperatura, al igual que la alta conductividad, son características de aguas provenientes de ambientes termales<sup>10</sup>; sin embargo, debido al bajo volumen de descarga del complejo termal en el arroyo, no se observaron cambios significativos en estos parámetros entre el punto anterior y el posterior a la zona de descarga.

En el arroyo El Sauce, las concentraciones de las bacterias indicadoras de contaminación fecal superaron, en su mayoría, los límites aceptados. Esto podría relacionarse con la presencia de animales en las cercanías del arroyo y con el uso del agua por los bañistas. Gutiérrez-Cacciabue et al.<sup>13</sup> también informaron para la provincia de Salta elevadas concentraciones de bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas de río con actividad recreativa en una zona rural, y, de manera similar, esto coincidió con la época de mayor actividad recreativa, en los meses cálidos del año (entre octubre y marzo).

Es bien conocida la potencialidad patogénica de *Pseudomonas* sp., así como su persistencia en el ambiente<sup>2,3</sup>. Dicho microorganismo fue detectado en todos los puntos de muestreo y en mayores concentraciones en el agua del arroyo, del mismo modo que el resto de las bacterias analizadas. Por otro lado, la carga bacteriana en el agua proveniente del complejo termal se encuentra en concordancia con la informada en los trabajos de Mohd Hussain et al.<sup>20</sup> y Reyes-Betlla et al.<sup>26</sup>, quienes señalaron que las concentraciones de bacterias indicadoras de contaminación fueron uniformes en



**Figura 4** Número de aislamientos obtenidos en las sucesivas campañas de monitoreo. AVL: amebas de vida libre cultivables; ACAN: *Acanthamoeba* spp. identificadas por amplificación del segmento conservado del ARN ribosomal 18S. Todos los aislamientos se realizaron en ANN a 30 °C.



**Figura 5** Relación evolutiva de los aislamientos de *Acanthamoeba* spp. obtenidos en este estudio de los puntos P1 (en verde), P2 (en rosa) y P3 (en gris). Todas las secuencias (MN071400 - MN071414) se encuentran disponibles en la base de datos GenBank, del NCBI.

el tiempo. Por lo tanto, la descarga del complejo termal no tiene un efecto directo en la contaminación microbiológica general del agua del arroyo con actividad recreativa.

Debido a la problemática de las parasitosis en la salud humana, existe la necesidad de conocer el rango de distribución y las posibles fuentes de contaminación de las especies patógenas<sup>15</sup>. Los protozoos y helmintos encontrados en el presente trabajo son considerados amenazas para la salud, especialmente en niños y personas con el sistema inmunitario comprometido<sup>6,15</sup>. Tanto *Ascaris* como los ancilostomídeos son reconocidos por la OMS como helmintos transmitidos por el suelo (HTS) y agentes causales de enfermedades tropicales desatendidas<sup>25</sup>. La sintomatología clínica de mayor relevancia asociada a *Ascaris* es la malabsorción en el intestino, y la asociada a ancilostomídeos, el

desarrollo de anemia<sup>23,25</sup>. El protozoo no amebiano *Giardia* es reconocido como uno de los agentes causales de enfermedades gastrointestinales transmitidas por el agua de mayor prevalencia en Argentina<sup>27</sup>. La forma de contraer una enfermedad por alguno de estos parásitos varía según la especie: puede ser por la ingesta involuntaria (*Ascaris*, *Giardia*) o por la penetración cutánea (ancilostomídeos). Considerando que los sitios de monitoreo elegidos en este trabajo son ambientes de uso recreativo, donde el tipo de actividades desarrolladas puede llevar a la ingesta o al contacto cutáneo con los parásitos, se puede inferir que existe probabilidad de infestación por parte de las personas que utilicen esta clase de ambientes.

Aramayo et al.<sup>3</sup> realizaron un análisis epidemiológico exhaustivo de los casos de diarreas y parasitosis

correspondientes al año 2005 en una zona de la ciudad de Salta atravesada por el río Arenales, altamente contaminado. En ese estudio se concluyó que, a diferencia de las diarreas, que tenían un patrón estacional, las parasitosis eran constantes a lo largo del año. Algunos años más tarde se realizó un monitoreo intensivo en el río Arenales y se verificó la presencia constante de parásitos diversos<sup>23</sup>. Aunque es esperable que la exposición al agua de este río impacte sobre la salud de la población, aún no se ha podido establecer fehacientemente esta relación, principalmente porque se suelen notificar diagnósticos de «posibles parasitosis», pero no se realiza el seguimiento individual de los casos. Esto es una clara deficiencia del sistema de salud.

En otro trabajo también realizado en la provincia de Salta, en el que se investigaron distintos cuerpos de agua usados con fines recreativos, Gutiérrez Cacciabue et al.<sup>13</sup> detectaron protozoos y helmintos que afectan al hombre, como *Giardia* y *Ascaris*. Particularmente, *Giardia* no presentó marcada estacionalidad en el seguimiento, a diferencia de *Ascaris*, que solo se detectó en los meses cálidos.

Es sabido que la prevalencia de los parásitos *Ascaris*, *Giardia* y ancilostomideos está asociada a ambientes tropicales y subtropicales. En este sentido, Alvarez di Fino et al.<sup>1</sup> realizaron un mapa de riesgo de HTS en Argentina, teniendo en cuenta las características ambientales, del suelo y socioeconómicas, y señalaron una elevada probabilidad de que alguno de los helmintos, *Ascaris* o ancilostomideos ocasionen infestación en personas de la provincia de Salta. Asimismo, Rivero et al.<sup>27</sup> observaron una asociación positiva entre la incidencia de HTS con la del protozoo *Giardia* en análisis parasitológicos clínicos de la República Argentina.

La presencia y la actividad de los bañistas en las zonas recreativas aumentan a medida que las temperaturas se tornan cálidas; sin embargo, la presencia de animales domésticos y de ganado bovino y porcino es independiente de las temperaturas y se verifica durante todo el año<sup>13</sup>. Esta observación, junto con la detección de otros parásitos (como *Ascaris*, ancilostomideos y *Giardia*, además de amebas), lleva a la hipótesis de que son los animales circundantes y las personas que hacen uso del recurso los responsables de la contaminación parasitaria del arroyo El Sauce. En ese sentido, es probable que parte de la contaminación de las aguas recreativas en zonas rurales sea de origen humano. Menghi et al.<sup>19</sup> estudiaron una comunidad de 112 pobladores originarios de 1 a 49 años del Departamento de San Martín, también en la provincia de Salta, y observaron que 106 (94,6%) fueron positivos para algún enteroparásito. De estos últimos, *Giardia* fue el más frecuente (27,7%). Si bien no detectaron *Ascaris* ni ancilostomideos, sí encontraron otras especies de helmintos, como *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura* y uncinarias.

En otro estudio que abarcó nueve provincias de Argentina, Navone et al.<sup>22</sup> hicieron un relevamiento para conocer la prevalencia de individuos parasitados y su distribución regional. En ese contexto se analizaron muestras fecales de 66 menores de 14 años del Departamento de Molinos, en la provincia de Salta. De estos, 40 mostraron parasitosis, y el porcentaje más elevado de infestación correspondió a *Giardia*, con el 27,3% de los casos. A diferencia de lo informado por Menghi et al.<sup>19</sup>, en los individuos estudiados en

el Departamento de Molinos la única especie de helminto encontrada fue *Enterobius vermicularis*, con una frecuencia de infestación del 13%.

Otros microorganismos con potencial patogénico oportunista son algunas especies de AVL. El método de aislamiento en placa empleado en este trabajo favorece el desarrollo de todas aquellas amebas resistentes al proceso de concentración, lo que explica el mayor número de aislados de AVL con capacidad de desarrollar un estado de resistencia, como el de quiste<sup>21,29</sup>. Algunos trabajos muestran la conveniencia de aislar AVL a diferentes temperaturas (30 y 42 °C), con la premisa de que aislar AVL a una sola temperatura puede indicar una menor tolerancia a cambios térmicos<sup>21</sup>. De hecho, la termotolerancia en el crecimiento de estas amebas se ha propuesto como factor de virulencia, dado que las amebas con mayor plasticidad para crecer a diferentes temperaturas y osmolaridades se asocian con un mayor grado de virulencia<sup>21</sup>.

Todos los aislados identificados en este trabajo correspondieron al género *Acanthamoeba*, y la mayoría mostraron relación filogenética con el genotipo T4. Las secuencias nucleotídicas de los aislados usadas como referencia en el árbol filogenético pertenecen al genotipo T4 y provienen de diferentes matrices: GU586221 de agua potable<sup>32</sup>; KY751413 de agua de río; KX018028 de un perro, y KT892806 de suelo, lo que confirma el carácter cosmopolita y la mayor prevalencia del genotipo T4 dentro de *Acanthamoeba*<sup>12</sup>. El genotipo T4 es conocido por su gran diversidad genética, con siete subtipos, A-G<sup>7</sup>, y por su asociación con tres enfermedades oportunistas para el hombre: queratitis amebiana, en la córnea; encefalitis granulosa, como afección del sistema nervioso central, y acantamebiasis cutánea, como afección nasofaríngea y de la piel<sup>7</sup>. Si bien no se pudo determinar el potencial patogénico de los aislados en el presente trabajo, su identificación molecular da indicios del riesgo para la salud del genotipo presente.

## Conclusiones

A la luz de lo expuesto, podemos concluir que es necesario monitorear el agua de uso recreativo para evitar enfermedades transmitidas por este recurso. Los indicadores bacterianos representan una herramienta históricamente fiable en la evaluación de la contaminación de origen fecal, y en este trabajo, eso queda bien reflejado. Si bien ya existía contaminación bacteriológica en el arroyo El Sauce, el aporte del agua del complejo termal suma una nueva fuente de contaminación sobre el cuerpo de agua. Las diferentes maneras de transmisión de las formas infectantes de los parásitos detectados nos sugieren que no existe una sola fuente de contaminación parasitaria, y que estas podrían ser propias del ambiente, deberse a la actividad humana o asociarse a la presencia de animales del lugar. Los aislamientos amebianos del género *Acanthamoeba* ponen de manifiesto un potencial riesgo para los usuarios de estos ambientes. En suma, la calidad del agua con uso recreativo debe ser estudiada de manera integral y continua, considerando variables fisicoquímicas y microbiológicas, incluyendo los elementos parasitarios, es decir, helmintos y protozoos.



## Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSa) mediante los proyectos PICT 2017-1909 y N.º 2254, respectivamente. DGSJ es becario doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

## Bibliografía

1. Alvarez di Fino EM, Rubio J, Abril MC, Porcasi X, Periago MV. Risk map development for soil-transmitted helminth infections in Argentina. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14:e0008000.
2. Apha Awwa WE. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. 2005.
3. Aramayo CF, Gil JF, Cruz MC, Poma HR, Last MS, Rajal VB. Diarrhea and parasitosis in Salta, Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3:105–11.
4. Chaúque BJM, Dos Santos DL, Anvari D, Rott MB. Prevalence of free-living amoebae in swimming pools and recreational waters, a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res*. 2022;121:3033–50.
5. Chávez-Díaz LV, Gutiérrez-Cacciabue D, Poma HR, Rajal VB. Sediments quality must be considered when evaluating freshwater aquatic environments used for recreational activities. *Int J Hyg Environ Health*. 2020;223:159–70.
6. Cociancic P, Torrusio SE, Garraza M, Zonta ML, Navone GT. Intestinal parasites in child and youth populations of Argentina: Environmental factors determining geographic distribution. *Rev Argent Microbiol*. 2021;53:225–32.
7. Corsaro D. Update on *Acanthamoeba* phylogeny. *Parasitol Res*. 2020;119:3327–38.
8. Crone S, Vives Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, Martínez García E, Rojas Acosta C, Catalina Gomez Puerto M, Calum H, Whiteley M. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*. 2020;128:220–31.
9. European Economic Commission. Concerning the quality required of surface water intended for the abstraction of drinking water in Member States. *Official Journal of the European Communities*. 1975;194:25.
10. Fabros MR, Diesta XR, Oronan JA, Verdejo KS, Garcia JA, Romey S, Milanez GD. Current report on the prevalence of free-living amoebae (FLA) in natural hot springs: A systematic review. *J Water Health*. 2021;19:563–74.
11. Fewtrell L, Bartram J. *Water quality: Guidelines, standards & health*. IWA Publishing; 2001. p. 30.
12. Fuerst PA, Booton GC, Crary M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62:69–84.
13. Gutiérrez-Cacciabue D, Juárez MM, Poma HR, Garcé B, Rajal VB. Cuantificación y evaluación de la estacionalidad de elementos parasitarios en ambientes acuáticos recreativos de la provincia de Salta, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2014;46:150–60.
14. Health Canada. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document: Turbidity*. Health Canada. 2012.
15. Juárez MM, Rajala VB. Parasitosis intestinales en Argentina: principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45:191–204.
16. Karaman U, Koloren Z, Karanis P. Survey and first report of *Acanthamoeba* T4 genotype in natural spring water resources in the Black Sea, Turkey. *J Water Health*. 2022;20:193–204.
17. Kofman A, Guarner J. Infections caused by free-living *Amoebae*. *J Clin Microbiol*. 2022;60:e00228–321.
18. Kuhn RC, Oshima KH. Evaluation and optimization of a reusable hollow fiber ultrafilter as a first step in concentrating *Cryptosporidium parvum* oocysts from water. *Water Res*. 2001;35:2779–83.
19. Menghi CI, Iuvaro FR, Dellacasa M, Gatta CL. Investigación de parásitos intestinales en una comunidad aborigen de la provincia de Salta. *Medicina (Buenos Aires)*. 2007;67:705–8.
20. Mohd Hussain RH, Ishak AR, Abdul Ghani MK, Ahmed Khan N, Siddiqui R, Shahrul Anuar T. Occurrence and molecular characterisation of *Acanthamoeba* isolated from recreational hot springs in Malaysia: Evidence of pathogenic potential. *J Water Health*. 2019;17:813–25.
21. Nageeb MM, Eldeek HE, Attia RA, Sakla AA, Alkhalil SS, Farrag HM. Isolation and morphological and molecular characterization of waterborne free-living amoebae: Evidence of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Vahlkampfiidae* in Assiut, Upper Egypt. *PLoS One*. 2022;17:e0267591.
22. Navone GT, Zonta ML, Cociancic P, Garraza M, Gamboa MI, Giambelluca LA, Dahinten S, Oyhenart EE. Estudio transversal de las parasitosis intestinales en poblaciones infantiles de Argentina. *Rev Panam Salud Publica*. 2017;41:e24.
23. Poma HR, Cacciabue DG, Garcé B, Gonzo EE, Rajal VB. Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Sci Total Environ*. 2012;433:98–109.
24. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res*. 2007;41:1411–22.
25. Ravindran VB, Soni SK, Ball AS. A review on the current knowledge and prospects for the development of improved detection methods for soil-transmitted helminth ova for the safe reuse of wastewater and mitigation of public health risks. *Water*. 2019;11:1212.
26. Reyes-Batlle M, Díaz FJ, Sifaoui I, Rodríguez-Expósito R, Rizo-Liendo A, Pintero JE, Lorenzo-Morales J. Free living amoebae isolation in irrigation waters and soils of an insular arid agroecosystem. *Sci Total Environ*. 2021;753:141833.
27. Rivero MR, Feliziani C, de Angelo C, Tiranti K, Salomon OD, Touz MC. *Giardia* spp., the most ubiquitous protozoan parasite in Argentina: Human, animal and environmental surveys reported in the last 40 years. *Parasitol Res*. 2020;119:3181–201.
28. Rosado-García FM, Guerrero-Flórez M, Karanis G, Hinojosa MD, Karanis P. Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. *Int J Hyg Environ Health*. 2017;220:783–98.
29. Sanguino-Jorquera DG, Rajal VB, Juárez MM, Poma HR, Irázusta VP. *Acanthamoeba* and a bacterial endocytobiont isolated from recreational freshwaters. *Parasitol Res*. 2022;121:3693–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-022-07651-z>.
30. Scheid P. Free-living amoebae as human parasites and hosts for pathogenic microorganisms. *Proceedings (MDPI)*. 2018;2:692, <http://dx.doi.org/10.3390/proceedings2110692>.
31. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38:3022–7.
32. Trzyna W, MbUgUA MW, Rogerson A. *Acanthamoeba* in the domestic water supply of Huntington, West Virginia, USA. *Acta Protozool*. 2010;49:9–15.
33. USEPA, United States Environmental Protection Agency. Method 1106.1: enterococci in water by membrane filtration using

- membrane-*Enterococcus*-esculin iron agar (mE-EIA), 2002; EPA-821-R-02-021. Washington DC, EE.UU.
34. USEPA, United States Environmental Protection Agency (2012). Recreational water quality criteria, office of water. United States Environmental Protection Agency, 2012; Washington, DC, EE.UU.
  35. USEPA, United States Environmental Protection Agency. Method 1603: Escherichia coli (E. coli) in water by membrane filtration using modified membrane thermotolerant Escherichia coli agar (Modified mTEC), 2014. EPA-82 1-R-14-010.
  36. [World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: First addendum to the fourth edition. 2017.](#)