

Diversidad enteroparasitaria en afluentes del río La Villa y detección de *cryptosporidium* spp. de importancia sanitaria

Enteroparasitic diversity in tributaries of the La Villa river and detection of *cryptosporidium* spp. of sanitary importance

Julio César Mora Quintero

Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Azuero
Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá
<https://orcid.org/0009-0006-5564-522X>

Autor de correspondencia: julio1900mora@gmail.com

Lorena Michelle Coronado Vásquez

Investigadora Postdoctoral, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de
Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT AIP)
Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá
<https://orcid.org/0000-0001-6755-3118>
lcoronado@indicasat.org.pa

Alexis De La Cruz Lombardo

Investigador Postdoctoral y Catedrático, Universidad de Panamá
Centro Regional Universitario de Azuero, Panamá
<https://orcid.org/0000-0002-1938-6535>
alexisdelac26@gmail.com

Recepción: 19/04/26

Aceptado: 17/05/26

DOI <https://doi.org/10.48204/j.scientia.v36n2.a9750>

Resumen

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la calidad de la matriz de agua superficial en afluentes del Río La Villa en Los Santos, mediante la cuantificación parasitaria de los organismos de vida libre en dicha matriz, con un enfoque en recuperación del género *Cryptosporidium* spp. mediante pruebas moleculares como PCR, se utilizó el protocolo 1623 para recuperación de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de EPA como estándar para la captación de la mayor cantidad de formas

parasitarias posibles, los resultados mostraron una diversidad parasitaria amplia los cuales se dividieron en grupos para un mejor estudio dando diferencias significativas entre los géneros, al observar ooquistes del género *Cryptosporidium* spp. mediante tinción específica se optó por realizar pruebas PCR para confirmar la presencia de este parásito de importancia sanitaria en la región, estadísticamente los datos nos dicen que la hipótesis nula se rechaza y las medias de los grupos no son iguales y dichas medias se dividieron en 3 grupos los cuales son: significativos, intermedios y no significativos para su mejor comprensión con dichos resultados se abrieron investigaciones sobre este parásito de interés sanitario y su relación a parámetros fisicoquímicos en distintas matrices de agua.

Palabras Claves: Agua superficial, calidad del agua, medio ambiente, parasitología.

The primary objective of this study was to evaluate the quality of the surface water matrix in tributaries of the La Villa River, located in Los Santos, through the parasitic quantification of free-living organisms present in this matrix, particular emphasis was placed on the recovery of *Cryptosporidium* spp. using molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR). The EPA Method 1623 protocol was employed as the standard procedure for the recovery of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., aiming to maximize the detection of parasitic forms. The results revealed a broad parasitic diversity, which was subsequently categorized into groups to facilitate analysis, demonstrating significant differences among genera. Upon the microscopic observation of *Cryptosporidium* spp. oocysts using specific staining techniques, PCR assays were conducted to confirm the presence of this pathogen of public health importance in the region. Statistical analysis indicated rejection of the null hypothesis, confirming that group means were not equal. These means were further classified into three categories—significant, intermediate, and non-significant—for improved interpretation. Based on these findings, further investigations were initiated to explore the relationship between this parasite of sanitary relevance and physicochemical parameters across different water matrices.

Keywords: Surface water, water quality, environment, parasitology.

Introducción

Las parasitosis intestinales constituyen uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Su morbilidad está ligada a la pobreza, la inadecuada higiene personal, la falta de servicios sanitarios, el inadecuado suministro de agua y la contaminación fecal; afecta principalmente a niños en países en desarrollo (Gonzales et al., 2018). El acceso a servicios de agua, saneamiento e higiene sin riesgos es un derecho humano que podría evitar que muchas personas sufran enfermedades gastrointestinales. Se calcula que las enfermedades diarreicas causan alrededor de 1,5 millones de fallecimientos cada año (Murray et al., 2013).

En el mundo, los patógenos presentes en el agua contaminada provocan dolor intenso, discapacidad e incluso la muerte. Estas enfermedades comunes relacionadas con parásitos presentes en el agua no tratadas (PANT) incluyen

giardiasis, esquistosomiasis, toxoplasmosis, equinococosis, amebiosis y criptosporidiosis (Gonzales et al., 2018; Hader et al., 2015)

A pesar del reconocimiento de la existencia de los parásitos desde la época de los egipcios, los parásitos intestinales continúan latentes con el correr de los años, lo cual provoca consecuencias en la salud del ser humano. Según Morales (2016), se estima que más de un cuarto de la población del mundo presenta parásitos, la más afectada por esto es la población infantil de bajos recursos (Espinosa et al., 2011).

La transmisión de enfermedades de origen hídrico está relacionada con la contaminación de origen fecal en aguas residuales y potables. Estas enfermedades son causadas por la presencia de parásitos, los cuales tienen una alta incidencia en la población infantil (Castillo y Fernández, 2020). *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp. se han seleccionado como organismos indicadores de contaminación de origen parasitario y su análisis es útil para evaluar la calidad del agua y determinar el riesgo sanitario (Manjarrez et al., 2019).

Los ooquistes de protozoarios y huevos de helmintos causan afecciones intestinales siendo el agua el vehículo más importante para diseminarlos. Las plantas potabilizadoras no han eliminado el riesgo de determinadas enfermedades, más bien han aumentado en muchos países. En Panamá, se desconoce si las medidas de calidad en el control de aguas son suficientes para prevenir estos contaminantes (Castillo et al., 2020)

El control de la transmisión por el agua plantea retos importantes, porque la mayoría de los agentes patógenos producen quistes, ooquistes o huevos que son extremadamente resistentes a procesos de desinfección, y en algunos casos a los de filtración, y considerando que los ooquistes son un potencial riesgo de transmisión para enfermedades zoonóticas (OMS, 2006; Kumar., 2016).

Diversas investigaciones en aguas de consumo humano concuerdan que existe una mayor frecuencia de protozoarios que de helmintos, con una alta prevalencia de *Cryptosporidium* spp y *Giardia* spp. (Gallego et al., 2012). La existencia de estos protozoarios en reservas de aguas abiertas y suministros de aguas tratadas es debido a su alta resistencia en el ambiente a través de sus formas quísticas u ooquistes (Guillén et al., 2013; Juárez y Sandoval, 2016), además de géneros parasitarios que pueden ser transmitidos a través de aguas contaminadas, tenemos protozoarios como *Entamoeba* spp., *Balantidium* spp., y *Toxoplasma gondii* (única especie descrita para este género) (Winiecka-Krusnel et. al; 2009; Borchardt et al., 2009).

El clima tropical de la región hace que Panamá sea un área endémica e ideal para que se den infecciones por protozoos tales como: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Cyclospora cayetanensis*. Estas infecciones son muy fáciles de adquirir, porque estos organismos se encuentran en gran porcentaje en el ambiente y son difíciles de erradicar, debido a que tienen formas de resistencia conocidas como quistes y ooquistes, que les permiten sobrevivir a situaciones adversas y vivir en el ambiente en condiciones adecuadas de temperaturas y humedad, por más de un año (Guillén, 2016).

Anteriormente se han realizado estudios relacionados a las parasitosis en niños de la población panameña y analizado su relación con aguas, suelos y hortalizas como fuente potencial de enteroparásitos, sus resultados se han comparado con los obtenidos en la investigación de los argentinos Zonta et al., (2007), donde investigaron la misma problemática con poblaciones de su región en la cual tienen resultados similares, al igual panameños han investigado la fuente de posibles parásitos ambientales de aire y agua en otras partes más rurales de la extensión territorial como las comarcas cercanas al río Chagres donde la prevalencia del parasitismo es del 90 % según sus resultados (Arosemena et al.,

2013) y comparado con otras zonas rurales de Panamá donde también se alcanza un 66 % de positividad: Santa María en la provincia de Herrera, Coclesito y Escobal en la provincia de Colón, Guararé en la provincia de Los Santos, Boquete y Volcán en la provincia de Chiriquí (Rodríguez, 2013).

Según Gonzales et al. (2018) Panamá, como país tropical y con muchas personas que viven en condiciones de pobreza rural, no se escapa de esta realidad, pues las condiciones ambientales tales como las temperaturas cálidas, altos niveles de humedad ambiental, lluvias casi todo el año, alta cobertura vegetal que protege de la radiación en muchas zonas rurales, una amplia cantidad de vectores mecánicos y reservorios animales domésticos y silvestres, pueden favorecer la permanencia y dispersión de los parásitos en el ambiente; incluye los cuerpos de aguas que sirven de consumo y de fuente de irrigación a los cultivos.

Con lo anteriormente mencionado esta investigación tiene como finalidad evaluar la calidad de la matriz de agua superficial en algunas zonas del afluente del Rio La Villa en Los Santos, mediante la cuantificación parasitaria de los organismos de vida libre en dicha matriz, enfocándonos principalmente en confirmar la presencia del parásito *Cryptosporidium* spp. en la zona debido al aumento de la turbidez y mineralización del afluente en las últimas décadas, con ello se busca concientizar a la población panameña en especial a la región de Azuero la importancia del recurso hídrico con el que contamos mientras contribuimos a la divulgación científica del país al analizar o estudiar la presencia de este parásito protozoario que ha ganado relevancia en el sector sanitario en las últimas décadas.

Material y métodos

Colecta de las muestras

Se realizaron muestreos en distintos puntos del río La Villa mediante la técnica para recuperación de *Cryptosporidium* spp. 1623 propuesta por la agencia

de protección ambiental de Estados Unidos (EPA).

El consiste en la filtración de grandes volúmenes de agua para la captación de ooquistes en mayores proporciones, estas filtraciones se realizaron mediante un sistema de bombeo a combustible el cual constaba con filtros de acetato de celulosa de 1 μ de los cuales se recuperarían las formas parasitarias, el volumen final filtrado en cada muestreo fue de 1 000 L equivalentes a un total de 1 m³ por filtro, estos filtros fueron colocados en bolsas herméticas con una solución conservante de tween 80 + PBS al 0, 1 % para evitar la degradación en las formas parasitarias durante el traslado al laboratorio en hieleras.

Procesamiento de las muestras

Una vez las muestras se encuentran en el laboratorio se realizan cortes verticales con navajas estériles para poder desprender con mayor facilidad las tiras de acetato de celulosa del filtro, se depositan en frascos o nuevas bolsas rotuladas con las coordenadas de muestreo y parte del líquido en el que se transportó la muestra cuidando que las tiras se mantengan siempre sumergidas, se agitan los recipientes vigorosamente para desprender las formas parasitarias de las porosidades de las tiras de acetato.

Las muestras se depositan en tubos falcon de 15 mL, para centrifugar de 10 minutos a 3 500 RPM, luego se descarta, hasta que queden 2 mL de la muestra original para realizar lavados del pellet, y estos se realizan con 8 mL de solución saturada de NaCl dando un volumen final de 10 mL, se homogeniza la muestra con vortex y repetimos la centrifugación 10 minutos a 3 500 RPM. Después se rescata la parte superficial de la muestra para tinciones frescas con yodo en busca de huevos de helmintos, descartamos el sobrenadante restante hasta quedarnos con 2 mL de muestra para seguir con un segundo lavado con solución sheather centrifugando una última vez 10 minutos a 3 500 RPM, y se recuperan muestras de la superficie de los tubos para aplicar la tinción ácido resistente Zielh Neelsen en busca de protozoarios del género apicomplexa.

Para la recuperación de helmintos se realizó una tinción directa con yodolugol del líquido sobrante en las bolsas que contenían los filtros de acetato de celulosa; además, se realizó una filtración con discos de papel Wittman para separar el sedimento de la muestra, el cual se colocó en tubos falcon de 15 mL para centrifugar y realizar las pruebas de Willys Molloy. La misma consiste en la flotación de huevos y quistes de helmintos en una solución saturada de NaCl y la técnica de Sheather y esta posee un principio similar a la anterior técnica al sustituir la solución saturada de NaCl por una de sacarosa.

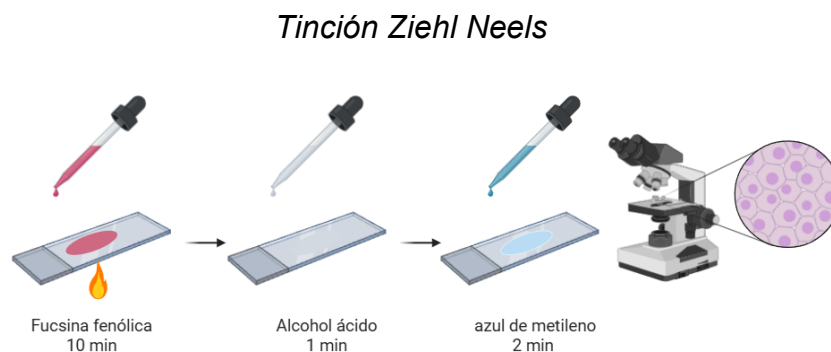
Cabe resaltar que dichas identificaciones son presuntivas identificadas de la mano de Atlas parasitológicos de la Organización Panamericana de la Salud 2020 y el libro de Parasitología tropical de Botero y Restrepo, a excepción del caso de *Cryptosporidium spp*, el cual se identificó con tinción específica y técnica molecular.

Tinción Ziehl Neelsen

Es la tinción encargada confirmar la presencia de las formas ooquíticas del género *Cryptosporidium spp*. Fue la tinción ácido resistente Ziehl Neelsen debido a su especificidad con las formas de vida que constan con pared lipídica gruesa, en el diagrama mostrado en la imagen # 1 se muestran los pasos a seguir en dicha tinción. Una vez fijado el frotis en la placa se vierte generosamente el compuesto de la fucsina fenólica la cual debe ser activada con calor, la placa se flamea con la ayuda de un mechero hasta empezar a emitir gases, luego de este proceso se toma el tiempo de tinción el cual es de 10 min en esta fase.

El siguiente paso es añadir el decolorante en este caso es el alcohol ácido, este se aplica generosamente en todo el frotis y se deja actuar por 1 min para luego enjuagar, por último, el tinte de contraste el cual es el azul de metileno este se deja actuar por 2 min se enjuaga la placa para dejarla secar y observar la presencia- ausencia de los ooquistes en el aumento 100 X.

Figura 1



Ensayo molecular

La metodología propuesta en esta fase de la investigación fue proporcionada por las investigaciones de diagnóstico molecular de Rochelle et al.,1997 y Osorio, 2019 a las cuales se le aplicaron alteraciones para la obtención de resultados satisfactorios.

La información recomienda realizar una PCR anidada para la detección molecular de *Cryptosporidium* spp, no obstante, hubo discrepancias a la hora de comparar la metodología estandarizada con los primeros resultados obtenidos, por lo cual se optó a utilizar una PCR convencional con ambos pares de primers y comparar la eficacia de ambos, los primers y sus especificaciones se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Descripción de primers utilizados

Primer forward	Secuencia	Primer reverse	Secuencia	Región de interés
cphsp2386F	5'-3' (CTGTTGCTTATGGTGC TGCTG)	cphsp2672R	5'-3' (CCTCTTGGTG CTGGTGGAAT A)	18Rs
HSP70Cryp F	5'-3' (ATGACATCATCTGAAG GTCC)	HSP70CripR	5'-3' (TTAGTCGACC TCTTCAACAG)	18Rs

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN en cultivo celular del kit de tejido de Macherey-Nagel nuleospin el consta de los siguientes pasos:

- Al concentrado de nuestras muestras en un medio líquido se le agregan 200 μ L de Buffer T1 más 25 μ L de proteínasa K y 200 μ L de buffer B3.
- Una vez añadidos todos los reactivos, se homogeniza la muestra con vórtex y se deja incubar de 10 a 15 minutos a una temperatura de 70 °C.
- Posterior a la incubación se le agregan 210 μ L de etanol puro a la muestra, esta se homogeniza y pasa a la columna de extracción.
- Centrifugamos la columna de extracción a 11 000 G durante 1 minuto, descartamos el sobrenadante y depositamos en un tubo nuevo para centrifugar una última vez a 11 000 G durante un minuto.
- Posterior a la de extracción de ADN se mide pureza y cantidad de ADN en el equipo nanodrop.

Preparación del Máster mix

Los reactivos, cantidades y concentraciones utilizados para la preparación del máster mix fueron proporcionados por las investigaciones de Rochelle et al.,1997 y Osorio, 2019 acoplados a los protocolos establecidos en los laboratorios de INDICASAT-AIP, dicha información se visualiza en la tabla 2

Tabla 2

Reactivos utilizados para la preparación de máster mix

Reactivo	Concentración	Volumen μ
Primer F	10 μ M	1 μ L
Primer R	10 μ M	1 μ L
H2O		8, 5 μ L
ADN	13, 2 ng	2 μ L
dNTP	200 μ M	0, 4 μ L
Taq. polimerasa	1.0 unidades	0, 2 μ L
Tampon 5X phusion HF	1X	0, 4 μ L
DMSO	3 %	0, 6 μ L

Termociclaje

En esta fase se realizaron adaptaciones a los protocolos preestablecidos en las investigaciones ya mencionadas en la etapa de annealing de la muestra realizando una gradiente a varias temperaturas obteniendo como mejor resultado la temperatura de 59 ° C, el perfil térmico se muestra en la tabla 3

Tabla 3

Perfil térmico de muestras

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	20 segundos
3	59 °C	45 segundos
4	72 °C	1 minuto
5	40 ciclos desde el paso 2	
6	72 °C	7 minutos
7	4 °C	∞

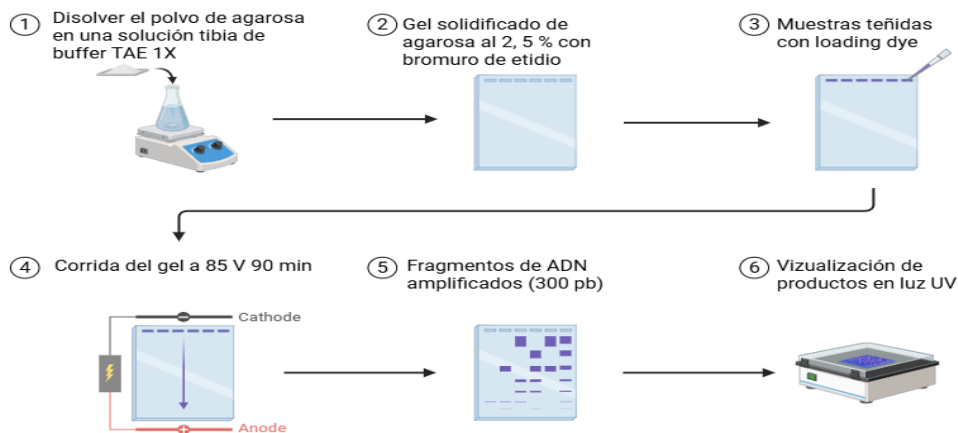
Electroforesis

La metodología empleada en esta fase se detalla claramente en la figura 2

Figura 2

Preparación y corrido del gel de agarosa.

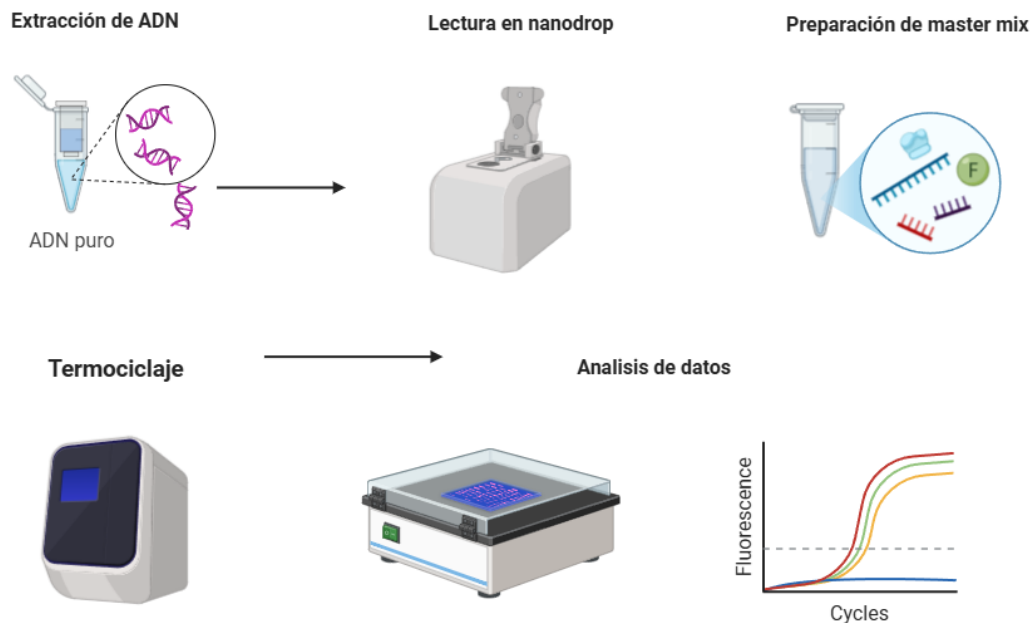
Electroforesis del gel agarosa al 2, 5 %



- El primer paso por realizar en esta fase fue la elaboración del gel de agarosa al 2, 5 % disolviendo 2, 5 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE el cual es teñido con bromuro de etidio una vez disuelta la agarosa.
- Una vez realizado el gel teñimos nuestras muestras termocicladas con 4 μ L de loading dye. para obtener un volumen final de 10 μ L.
- El corrido del gel de agarosa se realizó a 85 V durante 90 min.
- Posterior al corrido de gel se visualizan los productos en un transiluminador.

Figura 3

Protocolo simplificado de PCR



Resultados

Los datos crudos obtenidos arrojan una gran diversidad de formas parasitarias las cuales se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 4

Datos crudos

Formas parasitarias	Puntos de muestreo				
	P1	P2	P3	P4	P5
<i>Schistosoma Hamaetobium</i>	27	14	18	12	8
<i>Chilomastix Mesnili</i>	19	7	9	8	6
<i>Sarcoptes Scabei</i>	6	12	7	17	13
<i>Ripicephalus</i>	7	3	5	11	12
<i>Diatomeas</i>	32	28	33	23	17
<i>Enterobius</i>	21	13	11	17	19
<i>Cryptosporidium spp.</i>	7	3	9	12	8

A estos datos crudos se les la prueba Shapiro-Wilk para verificar el valor p y la normalidad de los datos teniendo como resultado lo siguiente:

Tabla 5

Resultados de la prueba Shapiro-Wilk

Parásito	W	p-value
<i>Schistosoma Hamaetobium</i>	0,949	0,7297
<i>Chilomastix Mesnili</i>	0,751	0,0305
<i>Sarcoptes Scabei</i>	0,936	0,6354
<i>Ripicephalus</i>	0,932	0,6135
<i>Diatomeas</i>	0,926	0,5663
<i>Enterobius</i>	0,952	0,7540
<i>Cryptosporidium spp.</i>	0,976	0,9144

Los resultados de esta prueba indican que los datos de por lo menos seis de los puntos de muestreos presentan datos normales dentro del rango aceptado del valor ($p > 0.05$) siendo el caso de *C. Menslini* el único que presenta un valor fuera del rango aceptado para considerarse normal; debido a esto, se recomienda aplicar la prueba Kruskal-Wallis como alternativa no paramétrica del ANOVA con la finalidad de mostrar la homogeneidad de los datos. Los resultados arrojaron que estos datos rechazan la hipótesis nula de igualdad entre los grupos indicando una dispersión amplia entre *C. Menslini* y los demás parásitos estudiados.

ANOVA One-Way

Los resultados obtenidos con esta prueba nos indican que el valor de p es mucho menor que 0.05, por lo tanto, muestran diferencias significativas entre los grupos analizados, lo que indica que las medias no son iguales y que el factor estudiado influye de manera importante en la variable dependiente. Además, las pruebas complementarias, como Levene y Welch, respaldan la validez del análisis al mostrar que las conclusiones se mantienen, aún bajo diferentes supuestos. En conjunto, estos resultados permiten afirmar que el factor evaluado produce un impacto real, consistente y estadísticamente significativo.

El ANOVA mostró diferencias altamente significativas entre los grupos ($F = 9.583$, $p < 0.001$). La homogeneidad de varianzas se cumple ($p > 0.05$), por lo que el modelo es válido. El tamaño del efecto fue grande ($\omega^2 = 0.59$), indicando que el 59 % de la variación total se debe a diferencias reales entre los grupos. El Bayes factor ($BF = 772.1$) proporciona evidencia decisiva a favor de diferencias entre grupos. En conjunto, los resultados indican que al menos un grupo difiere significativamente de los demás. Se recomienda aplicar la prueba post-hoc de Tukey para identificar cuáles grupos son significativamente diferentes entre sí.

- Rechaza la hipótesis nula (H_0):

Las medias de los grupos NO son iguales.

- Acepta la hipótesis alternativa (H_1)

Al menos un grupo difiere significativamente en su valor medio.

Análisis de Tukey

El análisis post-hoc Tukey confirmó específicamente entre qué grupos ocurrieron las diferencias detectadas por el ANOVA. Las comparaciones por pares mostraron que algunos grupos presentan medias significativamente distintas entre sí, lo que indica que el efecto del factor no es uniforme y varía dependiendo del nivel evaluado. Estas diferencias permiten identificar con precisión qué grupos contribuyen al efecto global significativo del ANOVA y ofrecen una visión más detallada de cómo se comporta la variable analizada entre los distintos tratamientos.

A. **Grupos con diferencias SIGNIFICATIVAS ($p < 0.05$):** indica que el grupo de las diatomeas es el que marca la diferencia. Es significativamente más alto que todos los demás grupos, excepto *Enterobius*.

B. **Grupo “intermedio”:** *Enterobius* no significativamente menor que Diatomeas, aunque Diatomeas tiene media mucho mayor. Esto significa que *Enterobius* está en el nivel medio, sin diferencias extremas.

C. **Comparaciones NO significativas ($p > 0.05$):** no muestran diferencias estadísticas, es decir, sus medias son parecidas ninguno de estos pares mostró diferencia estadística.

Discusión

Como control negativo para esta investigación se realizó la misma metodología con agua proveniente de la red de distribución de La Villa de Los Santos en la cual se encontraron organismos de vida libre como diatomeas,

levaduras y parásitos ciertamente en menor concentración, pero al igual sigue siendo una problemática según lo establecido en la regla de DGNTI-COPANIT 23-395-99 la cual dice que la presencia incluso en pequeñas concentraciones indican contaminación perjudicial para la salud del ser humano, lo cual la hace no apta para consumo. Resaltado esto, la comparación de los datos obtenidos en esta investigación con la literatura consultada con investigaciones realizadas en Panamá específicamente el río Chagres nos muestra que, aunque el 100 % de las muestras colectadas muestren resultados positivos en cuanto formas parasitarias el río La Villa cuenta con menor concentración y distintas especies a las investigaciones realizadas por Juárez y Sandoval 2021 quienes además compararon investigaciones previas en dicha cuenca hidrográfica a través del tiempo.

Si bien no hay investigaciones previas de enteroparásitos en la región de Azuero, es importante realizar estudios de monitoreo estacional ya que se observó un incremento significativo en los porcentajes de formas parasitarias en las aguas estudiadas, lo que nos indica un mal manejo de recursos del área agroganadera de la zona, como también el uso de letrinas cercanas a las afluentes estudiadas.

Además de los análisis parasitológicos se documentaron parámetros fisicoquímicos que fueron comparados con los rangos aceptados dentro del decreto No 75 de 4 de junio de 2008 norma primaria de calidad ambiental y niveles de calidad para las aguas continentales de uso recreativo con y sin contacto directo la cual arrojó resultados dentro de lo establecido.

Los resultados obtenidos muestran una mayor diversidad parasitaria en protozoarios de carácter entérico en comparación con la diversidad de helmintos en las fuentes hídricas estudiadas. Este hallazgo concuerda con la literatura consultada, como la investigación de Arosemena et al. (2018), quien reportó una mayor diversidad de protozoarios entéricos en los afluentes del río Chagres, registrando una abundancia del 74,2 %. En dicho estudio se destacaron formas

quísticas de amebas como *Blastocystis hominis* y *Giardia intestinalis*.

Sin embargo, los resultados de esta investigación difieren, ya que el parásito más reportado fue *Schistosoma haematobium*. En cuanto a helmintos, las investigaciones previas en la zona señalan a *Ascaris lumbricoides* como el más frecuente, mientras que en este estudio los más observados fueron *Enterobius vermicularis*. Estos helmintos presentan una morfología similar en el estadio larvario, pero difieren en su estado inmaduro, lo que permitió confirmar que en realidad se trataba de huevos de *Enterobius*.

En la fase molecular de detección del género *Cryptosporidium spp.* se esperaba alcanzar la identificación de la especie *C. parvum* mediante una PCR anidada. El protocolo planteado por Rochelle et al. (1997), modificado por Osorio (2019), presentó varias dificultades, por lo que se optó por utilizar una PCR convencional. Con este método se logró la detección a nivel de género, obteniéndose resultados satisfactorios, ya que las muestras resultaron positivas al amplificar el gen 18S rRNA y HSP70 del parásito *Cryptosporidium spp.* Estos hallazgos difieren de los reportados por Carrasco y Rojas (2024), quienes no obtuvieron resultados positivos en muestras recolectadas durante la temporada lluviosa y seca en la bahía de Panamá. Esta discrepancia podría deberse a variaciones en las matrices de agua estudiadas, al método de extracción empleado o a la cantidad de ooquistes por mililitro requerida en las muestras.

Durante la fase molecular se lograron resultados preliminares en términos de confirmación de muestras positivas para *Cryptosporidium spp.* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó la muestra del sitio 4, la cual durante la examinación microscópica mostró una mayor cantidad de quistes. Los resultados preliminares de la técnica de PCR fueron satisfactorios en cuanto a la extracción y calidad del ADN, con un valor de 13,2 ng/μL y una pureza A260/A230 de 1.82, dentro de los límites aceptables

para considerar el ADN lo suficientemente puro para utilizar con esta técnica.

Los cebadores empleados derivaron del protocolo descrito por Rochelle et al. (1997), modificado por Osorio (2019), quienes utilizaron distintos pares de cebadores: así, uno que amplifica el gen **HSP70** presente en el género *Cryptosporidium spp.* y otro que amplifica tanto el género como la especie *C. parvum*.

En las pruebas realizadas se probaron distintas temperaturas de annealing haciendo un gradiente para estandarizar la PCR con su mejor temperatura. En el carril 1 podemos ver el control negativo donde no amplificó nada, del carril 2 al 5 vemos la muestra de agua del sitio 4 y en el carril 6, la escalera de peso molecular.

Tabla 6

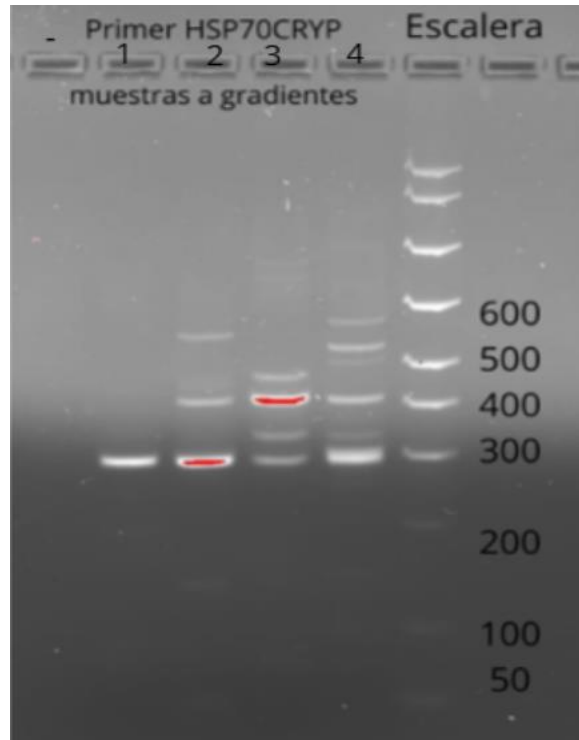
Deposición de muestras en el gel de agarosa

CARRIL	TEMPERATURA
-	Control negativo
#1	59° C
#2	58.1° C
#3	56.9° C
#4	56 ° C
#5	Escalera de peso molecular

El tamaño del amplicón esperado para una muestra positiva es de 307 a 311 pares de bases según la literatura citada. Por lo que se puede concluir que la mejor temperatura es de 59 y que la muestra probada es, en efecto, positiva para *Cryptosporidium spp.*

Figura 4

Resultados de pruebas PCR



Conclusión

Se confirmó la presencia de una alta diversidad de protozoarios entéricos en comparación con los helmintos en los distintos puntos de muestreo de la zona baja del río La Villa. Esta tendencia coincide parcialmente con estudios previos realizados en otras regiones del país, aunque en este caso es con *Schistosoma haematobium* y *Enterobius vermicularis*.

El análisis microscópico permitió identificar diferencias en la frecuencia de parásitos entre los puntos evaluados, indicando que algunos sitios presentan mayor carga parasitaria que otros. El análisis estadístico (One-Way ANOVA y Tukey) demostró diferencias significativas entre los grupos, verificando que la presencia de enteroparásitos varía según el sitio muestreado.

La fase molecular permitió confirmar la presencia del género *Cryptosporidium* spp., en al menos una de las muestras procesadas. A pesar de las dificultades encontradas con el protocolo de PCR anidada, el uso de PCR convencional permitió obtener un amplicón en el rango esperado (307–311 pb), validando así una muestra positiva.

Los resultados evidencian que los afluentes estudiados presentan riesgo potencial para la salud pública, especialmente al ser utilizados para actividades recreativas. La presencia confirmada de *Cryptosporidium* spp., organismo altamente resistente y con elevada carga infecciosa, refuerza la necesidad de monitoreo constante, tratamiento adecuado del agua y educación en higiene para reducir la transmisión de enfermedades entéricas.

En esta investigación se demostró que la mayor incidencia de parásitos en afluentes del río La Villa son microorganismos de naturaleza patógena de contaminantes fecales como lo son el género *Enterobius* spp. y las larvas de tipo *Strongyloides*, esto debido a la mala utilización o manejo de recursos de la población que utilizan estas aguas para recreación sin medidas básicas de higiene como también la alta tasa de actividades agropecuarias muy cercanas a los caudales de las aguas de la vertiente del río La Villa.

La taxonomía parasitaria de esta zona es bastante amplia teniendo diversos grupos de géneros y especies de protozoarios, helmintos, ácaros y organismos de vida libre como algas y diátomeas, demostrando que los parásitos más habituales en las zonas altas son enteroparásitos del género de los *Enterobius spp* los cuales son patógenos; pero tienen una baja resistencia a métodos desinfección básicos. En cuanto a la comparación con el último punto de muestreo en la zona baja los parásitos patógenos más habituales en este punto de muestreo son protozoarios, los cuales sí son más resistentes a métodos de desinfección básicos debido a que



cerca a estos puntos de muestreo se encontraron tuberías de desinfección con vaciado a los afluentes y aun así se encontraron estas formas parasitarias.

La correlación que poseen estas formas parasitarias con el sitio de muestreo se basa en las distintas actividades que se pudieran observar a lo largo del cauce utilizado para los muestreos de esta investigación los cuales van desde agricultura y sembrado de cultivos a la actividad agropecuaria como cría de ganado vacuno y porcino además de recreación.

Agradecimiento

A las doctoras Carmenza Spadafora, a la Licenciada Laura Pineda y a todo el centro de biología celular y molecular de enfermedades CBCMe de INDICASAT-AIP por toda la ayuda brindada en la fase experimental de esta investigación y en mi estancia por sus laboratorios de alta tecnología, a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación SENACYT por su ayuda como financiador de esta investigación en los laboratorios de INDICASAT-AIP en Ciudad del Saber.

Referencia bibliográfica

- Aladro-Lubel, M. A., & Olvera-Bautista, F. (2016). Los protozoarios ciliados como bioindicadores de la calidad del agua en sistemas acuáticos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 58(2), 74-83.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=67290>
- Arosemena, V., Castillo, C., & Guerra, G. (2018). Detección de enteroparásitosis humana y fuentes de contaminación ambiental en el río Chagres, Panamá. *Revista Venezolana De Salud Pública*, 2(2), 35-44. Recuperado a partir de <https://revistas.uclave.org/index.php/rvsp/article/view/1470>
- Borchardt MA, Bradbury KR, Alexander EC Jr, Kolberg RJ, Alexander SC, Archer JR, Braatz LA, Forest BM, Green JA, Spencer SK. Norovirus outbreak caused by a new septic system in a dolomite aquifer. *Ground Water*. 2011 Jan-Feb;49(1):85-97. doi: 10.1111/j.1745-6584.2010.00686.x



- Carrasco, Jacob y Rojas, Nelson (2024) Detección molecular de protozoos parásitos (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*) en muestras de agua y aire, provenientes de la bahía de Panamá durante la estación seca y lluviosa. Otra thesis, Universidad de Panamá. <http://up-rid.up.ac.pa/id/eprint/9370>
- Espinosa Morales, Madeline, Alazales Javiqué, Mercedes, & García Socarrás, Ada Margarita. (2011). Parasitosis intestinal, su relación con factores ambientales en niños del sector "Altos de Milagro", Maracaibo. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 27(3), 396-405. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252011000300010&lng=es&tlng=es
- Gallego, S., Santín, M., Y Caccio, S. M. (2012). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. *Parasitology Research*, 111(2), 635–645. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2882-3>
- González, K. L., Rivas, R. E. y Sandoval, N. (2018). Aguas, suelos y hortalizas como fuente potencial de enteroparásitos en niños de la escuela Majara, Capira, Tecnociencia, 20(1), pp. 5–26. Disponible en: <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/73>
- Guillén, N., Ramos, R., Y Olivo, C. (2013). Evaluación microbiológica de aguas destinadas al consumo humano. *Revista Cubana de Salud Pública*, 39(2), 256–267. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662013000200007
- Häder DP, Williamson CE, Wängberg SÅ, Rautio M, Rose KC, Gao K, Helbling EW, Sinha RP, Worrest R. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Jan;14(1):108-26. doi: 10.1039/c4pp90035a. PMID: 25388554
- Juárez, R., Y Sandoval, N. (2021). Identificación de enteroparásitos en aguas residuales del río Chagres. *Revista Biológica de Panamá*, 10(1), 21–30. <https://revistas.up.ac.pa/index.php/biologica>
- Kumar, T. (2016). Waterborne parasitic diseases. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(3), 667–678. DOI:10.1007/978-1-4419-0851-3_877
- Morales del Pino, J. R. (2016). Parasitosis intestinal en preescolares y escolares atendidos en el centro médico EsSalud de Celendín, Cajamarca. *Horizonte Médico (Lima)*, 16(3), 35–41. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2016.v16n3.06>
- Murray, C. J., Ortblad, K. F., Guinovart, C., Lim, S. S., Wolock, T. M., Roberts, D. A., Dansereau, E. A., Graetz, N., Barber, R. M., Brown, J. C., Wang, H., Duber,



- H. C., Naghavi, M., Y Dicker, D. (2014). Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 10.1016/S0140-6736(14)60844-8
- Organización Mundial de la Salud. (2006). *Guidelines for drinking-water quality* (3rd ed.). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43428>
- Osorio Delgado, L. (2019). *Detección molecular de Giardia, Blastocystis, Toxoplasma y Cryptosporidium* (Tesis de maestría). Universidad Nacional. <https://repositorio.una.ac.cr/>
- Rochelle, P. A., De Leon, R., Stewart, M. H., Wolfe, R. L., Y McLaughlin, J. B. (1997). Comparison of PCR, microscopy, and immunoassay. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 2029–2037. <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.2029-2037.1997>
- Rodríguez, C. (2013). *Parásitos intestinales en poblaciones infantiles de Panamá* (Tesis de licenciatura). Universidad de Panamá. <http://up-rid.up.ac.pa/>
- Román, A. D., & Alfonso, J. (2021). Calidad microbiológica del agua de consumo humano y su impacto en la salud pública. *Revista Científica en Ciencias de la Salud*, 3(1), 45-54. <https://doi.org/10.53732/rccsalud/03.01.2021.45>
- Solano, L., Acuña, D., & Rivero-Rodríguez, Z. (2018). Calidad parasitológica del agua y prevalencia de enteroparasitosis en una comunidad indígena venezolana. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 42, e129. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.129>
- Winiecka-Krusnel, J., Linder, E., Y Pehrson, P. O. (2009). Free-living amoebae as vectors. *Parasitology Research*, 104(3), 697–705. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1247-4>
- Zonta, M. L., Navone, G. T., Y Oyhenart, E. E. (2007). Parasitosis intestinales en niños argentinos. *Parasitología Latinoamericana*, 62(1), 54–60. 10.4067/S0717-77122007000100009