



Neotropical Helminthology



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

STANDARDIZATION AND VALIDATION OF THE WILLIS PARASITOLOGICAL TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF GEOHELMINTHS EGGS IN BEACH SAND SAMPLES

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARASITOLÓGICA WILLIS PARA LA DETECCIÓN DE HUEVOS DE GEOHELMINTOS EN MUESTRAS DE ARENA DE PLAYA

Arli Guerrero-De Abreu^{1,2}; Jhon Jesús-Arzapalo³;
Doménica Carolina Cannova-González³ & Elizabeth Ferrer-Jesús²

¹Prácticas Profesionales de Parasitología, Departamento de Estudios Clínicos, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo Sede Carabobo, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED) y Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Venezuela.

³Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Carabobo, Venezuela.

*Corresponding author: elizabeth.ferrer@gmail.com

ABSTRACT

The identification of geohelminths in the environment allows the evaluation of levels of fecal contamination and the risk of parasitic transmission. The objective of the present work was to standardize and validate the Willis parasitological technique for the detection of geohelminth eggs (e) in beach sand samples. One g, 5 g and 10 g of sterile sand were contaminated with a suspension of hookworms eggs in 0.85% Saline Solution (SS) at three different concentrations (100 e·g⁻¹ sand, 200 e·g⁻¹ sand, 400 e·g⁻¹ sand). The validation was carried out with a suspension of eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758), *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) and Hookworms in SS, at the concentrations of 400 e·g⁻¹ and 800 e·g⁻¹ as well as a sampling in Playa Blanca, Carabobo state and the Caño Pendare amerindians community in Cedeño municipality, Bolívar state, Venezuela. The optimal working conditions were 10 g of sand contaminated with a concentration of 400 e·g⁻¹ (p = 0.00), with significant differences between variations in suspension concentration (p = 0.00), but not between the series of contaminated sand (p = 0.63), demonstrating that the parasitic concentration is directly proportional to the number of eggs recovered (r = 0.82, p = 0.00). In the validation, it was demonstrated that the percentage of recovery varies according to the species, the eggs of hookworms showed greater recovery. Although there were no parasitic forms during the sampling of Playa Blanca, the presence of *A. lumbricoides* eggs was detected in 18.5% of the soil samples from the Caño Pendare community, demonstrating the effectiveness of the standardized technique of Willis in soil samples.

Keywords: Beach – geohelminths – parasites – sand – Willis technique – zoonosis

doi:10.24039/rmh2020141612

RESUMEN

La identificación de geohelminthos en el medio ambiente permite evaluar los niveles de contaminación fecal y el riesgo de transmisión parasitaria. El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar la técnica parasitológica Willis para la detección de huevos (h) de geohelminthos en muestras de arena de playa. Se contaminaron 1 g, 5 g y 10 g de arena con una suspensión de huevos de Anquilostomideos en Solución Salina Fisiológica 0,85% (SSF) a tres concentraciones distintas (100 h·g⁻¹ arena, 200 h·g⁻¹ arena, 400 h·g⁻¹ arena), se aplicó la técnica de Willis con solución de NaCl 33% p/v y se contaron los huevos recuperados. La validación se realizó con una suspensión de huevos de *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758), *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) y Anquilostomideos en SSF, a concentraciones de 400 h·g⁻¹ y 800 h·g⁻¹ así como un muestreo en Playa Blanca edo. Carabobo y en una comunidad indígena Caño Pendare, edo. Bolívar. Las condiciones óptimas de trabajo fueron 10 g de arena contaminadas a una concentración de 400 h·g⁻¹ (p=0,00), con diferencias significativas entre variaciones de concentración de la suspensión (p = 0,00) no así, entre las serie de arena contaminadas (p = 0,63), demostrando que la concentración parasitaria guarda relación directamente proporcional al número de huevos recuperados (r=0,82; p = 0,00). En la validación se demostró que el porcentaje de recuperación varía en función a la especie, siendo los huevos de Anquilostomideos los de mayor recuperación. Aun cuando, no se evidenciaron formas parasitarias durante el muestreo de Playa Blanca, se detectó la presencia de huevos de *A. lumbricoides* en 18,5% de las muestras de suelo de la comunidad Caño Pendare, demostrando la efectividad de la técnica estandarizada de Willis en muestras de suelo.

Palabras clave: Arena – geohelminthos – parásitos – playa – técnica Willis – zoonosis

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis son problemas de salud pública a nivel mundial donde aproximadamente 1500 mill de personas, casi el 24% de la población mundial, está infectada por geohelminthos, estimándose que una de cada tres personas está infectada por estos parásitos y cerca 46 mill de niños entre 1 y 14 años están en riesgo de infectarse (OMS, 2019). En la última década se ha optado por evaluar la parasitosis ambiental en zonas de alta densidad de población humana y animal, tales como parques urbanos, plazas públicas, playas, zonas de recreación, en escuelas y paseos públicos en localidades urbanas, suburbanas y rurales (de Oliveira *et al.*, 2011); proporcionando información útil acerca de la magnitud del problema de salud pública, y establecer prioridades en las zonas geográficas de mayor riesgo de contaminación para el control enfermedades parasitarias y reducción de su prevalencia (Ziegelbauer *et al.*, 2012).

Por ende, países como Estados Unidos y Brasil, a través de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, USEPA, (2000) y el Consejo Nacional del Medio Ambiente en Brasil (CONAMA, 2002); respectivamente, estipulan un monitoreo periódico de las condiciones de calidad sanitarias de arena de costa, así como del agua de mar para la clasificación de un balneario como apto o no para actividades de recreación. En la República Bolivariana de Venezuela no existe marco legal ni normativa nacional que contemple la detección de posibles parásitos contaminantes para el humano en la arena de playa ni agua de mar lo que constituye un factor de mayor exposición para infecciones (MPPPA, 2002, 2006). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de formas parasitarias en arena de playa (Guerrero *et al.*, 2014; Guerrero *et al.*, 2015) que expone una fuente de infección importante para la población venezolana.

Existen muchas variables que pueden influir en la recuperación de formas parasitarias en muestras de

tierra, entre las que se encuentran las características y composición del suelo (composición fisicoquímica, granulométrica, porcentaje de humedad, temperatura y pH) (Cazorla *et al.*, 2007; Hassan & Oyebamiji, 2018), condiciones ambientales (longitud, latitud, sombreado, localización geográfica) (Montalvo-Sabino *et al.*, 2014), sanitarias (densidad poblacional canina y humana, presencia de materia orgánica fecal, entre otras) así como el procedimiento para la recolección de muestras de suelo tales como profundidad (Cáceres *et al.*, 2004), extensión de terreno muestreado, hora de muestreo y diseño del muestreo (Milano & Oscherov, 2002; Devera *et al.*, 2008; Cavalcante & Gagliani, 2011; de Oliveira *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2014). Es igualmente importante considerar las interacciones entre la textura del suelo, la estructura de flotación y las soluciones empleadas en la técnica (Nunes *et al.*, 1994; Oge & Oge, 2000; Mandarino-Pereira *et al.*, 2010; Tavalla *et al.*, 2012), por ende los resultados de las investigaciones de parásitos en suelos han sido muy variables, incluso utilizando una misma técnica (Bojanich *et al.*, 2015).

La técnica de Willis (Willis, 1921) es una de las más antiguas en coprodiagnóstico, fundamentada en el principio de flotación simple de huevos de helmintos con densidad inferior a 1200, y que no requiere de mayores equipamientos (Pérez & Raña, 2016). A partir de ésta se han derivado muchas modificaciones procedimentales (Cazorla *et al.*, 2007; Devera *et al.*, 2015; Pérez & Raña, 2016) para adaptarla particularmente al procesamiento de muestras de tierra.

Se denota la necesidad de estandarizar y validar la técnica parasitológica de Willis para la recuperación de huevos de helmintos en muestras de arena de playa, que permita su recomendación para posteriores investigaciones de frecuencia parasitaria en suelos de playas con gran transitabilidad de personas susceptibles, para identificar las zonas de riesgo, por lo que se planteó como objetivo estandarizar la técnica parasitológica de Willis para la detección de huevos de geohelmintos en muestras de arena de playa y validar la técnica con muestras de arena contaminada experimentalmente con diferentes especies y cantidades de huevos de helmintos, así como con muestras de suelo de Playa Blanca del Municipio Puerto Cabello edo. Carabobo y de la

comunidad indígena Caño Pendare, edo Bolívar, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló una investigación de diseño experimental, descriptivo, de campo, de corte transversal. Se preparó un *pool* de dos Kg de arena procedentes de diversas playas de Puerto Cabello (El Palito, Playa Blanca, Quizandal), edo. Carabobo, Venezuela a fin de minimizar interferencias por variaciones granulométricas. Dicho *pool* fue esterilizado en autoclave y almacenado en frasco de vidrio con tapa hasta el momento de su uso. Las unidades experimentales consistieron en muestras de arena de 1, 5 y 10 g dispuestas en placas de Petri (6 cm de diámetro) y contaminadas a tres concentraciones diferentes (100 h (huevos) g⁻¹ arena, 200 h g⁻¹ arena y 400 h g⁻¹ arena) a partir de una suspensión de huevos de geohelmintos, a fin de evaluar el porcentaje de recuperación de parásitos tras aplicar la técnica de Willis. Este procedimiento se realizó por triplicado, llamándose “Serie 1 g”, “Serie 5 g”, “Serie 10 g”, cada una acompañada de un control positivo que consistió en la misma cantidad de arena de la serie, con el doble de la concentración de huevos calculados para la misma, y un control negativo que consistió en una cantidad de arena estéril igual que el calculado para la serie.

Suspensión de geohelmintos

Se elaboraron tres (3) suspensiones de concentrados de huevos de geohelmintos a fin de determinar las condiciones ideales de preservación de los mismos para desarrollar la fase experimental de estandarización de la técnica de Willis.

-Concentrado de huevos de Ascaris lumbricoides (Linnaeus, 1758), suspendidos en formalina al 10%

A partir de una deposición de adultos de *A. lumbricoides* obtenidos de la desparasitación de un paciente de una comunidad rural en el 2007, conservados en formalina al 10%. Las hembras adultas de *A. lumbricoides* se diseccionaron mediante un corte longitudinal con un bisturí N° 5 para exponer las vías uterinas y luego otro corte para extraer los huevos. Se resuspendieron los

huevos extraídos con solución salina fisiológica 0,85% (SSF) y se centrifugó a 1500 rpm por 2 min y 30 seg. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 30 seg. Se eliminó el sobrenadante para concentrar la suspensión. Se determinó la concentración de la suspensión de huevos realizada. Por último, se conservaron los huevos adicionando formalina al 10%.

-Concentrado de huevos de A. lumbricoides, suspendidos en tampón fosfato salino, (PBS, por sus siglas en inglés, Phosphate Buffer Saline)

Se extrajeron huevos a partir de las hembras adultas de *A. lumbricoides* preservadas en formalina al 10%, realizando el mismo procedimiento descrito inicialmente pero sustituyendo la formalina al 10% por PBS.

-Concentrado de huevos de Anquilostomideos sin preservantes

Se realizó una suspensión de huevos de Anquilostomideos a partir de 5,49 g de deposición fecal reciente de un paciente con una carga parasitaria de 11.822 h por g de heces (hgh), calculada según la técnica Kato Katz por duplicado. Seguidamente se realizó el tamizaje de toda la deposición fecal empleando una malla metálica de 210 puntos de porosidad, a fin de eliminar detritus y restos alimentarios. Se homogeneizó y se disolvió en solución salina al 0,85% ajustando su concentración a valores deseados para seguir el protocolo de estandarización.

Estandarización de la técnica de Willis para la recuperación de huevos de parásitos geohelminintos en muestras de arena de playa

Se realizaron pruebas pilotos que consistieron en la aplicación de la técnica de Willis en porciones de arena procesadas por triplicado (serie 1 g, serie 5 g y serie 10 g) a tres concentraciones distintas (100, 200 y 400 h·g⁻¹ arena) de cada suspensión de huevos de geohelminintos elaborada, seleccionando la que presentó mayor recuperación parasitaria. Con la suspensión de huevos de Anquilostomideos sin preservantes se realizó el protocolo de estandarización de la técnica, que consistió en nueve tratamientos según las variables manipuladas (Tabla 1).

Técnica de Willis

Seguidamente a la contaminación de las unidades

experimentales, se agregó suficiente solución saturada de cloruro de sodio al 33% hasta la boca de la placa de Petri, y se mezclaron con aplicadores de madera. Luego se colocó una lámina portaobjetos, se adicionó más solución hasta que se logró el contacto de la misma con la lámina. Se dejó reposar por veinte (20) min. Se procedió a voltear rápidamente para cuantificar microscópicamente la cantidad de huevos recuperados recorriendo toda la lámina con el microscopio óptico a 100X. Empleando la misma preparación, en cada placa de Petri, se puso en contacto una segunda lámina portaobjetos, dejando reposar por veinte (20) min.

Validación de la Técnica de Willis estandarizada

-Validación de la Técnica estandarizada de Willis con muestras de arena de concentración parasitaria conocidas

Se preparó un *pool* de muestras fecales frescas sin preservantes proveniente de dos pacientes de una comunidad indígena del estado Amazonas, con alta carga parasitaria, evaluados previamente en el marco de un proyecto de desparasitación de la Fundación Tierra Blanca del Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Carabobo, Venezuela. La suspensión de estos huevos de geohelminintos en solución salina al 0,85% se realizó de igual manera que para la suspensión de Anquilostomideos sin preservantes. Siguiendo las condiciones óptimas de trabajo para la Técnica de Willis; se contaminaron 10 g de arena a dos concentraciones parasitarias (400 h·g⁻¹ arena y 800 h·g⁻¹ arena) por triplicado a partir de la suspensión de huevos de geohelminintos en SSF preparada previamente. El control positivo para cada serie consistió en 10 g de arena contaminada con el doble de concentración parasitaria de cada serie.

-Validación de la Técnica estandarizada de Willis con muestras experimentales

Se realizó un muestreo de campo en dos lugares con características topográficas y condiciones granulométricas del suelo diferentes para evaluar comportamiento de la técnica de Willis en condiciones ambientales diversas.

-Validación de la Técnica estandarizada de Willis con muestras de arena de Playa Blanca, municipio Puerto Cabello, edo. Carabobo

Se llevó a cabo un muestreo de campo en el

Balneario Playa Blanca, municipio Puerto Cabello, en el mes de Abril 2018 (posterior a vacaciones de Semana Santa), en la cual se ha demostrado la presencia de formas parasitarias de interés sanitario (Guerrero *et al.*, 2014). Playa Blanca consta de un espacio territorial costero de aproximadamente 180 Km² y una extensión aproximada de 980 m de costa, ubicado en la zona central de Puerto Cabello, estado Carabobo, orientado al Norte con el Mar Caribe (MPPD, 2015), de coordenadas: 10°28'33.2"N 68°01'36.9"W.

Se trazaron dos (2) transectas, la primera correspondiente a la franja de arena mojada que corresponde justo a orilla del mar, y la otra a la franja de arena seca ubicada aproximadamente a unos 14 m de la orilla del mar. Se tomaron 5 puntos geográficos en cada franja, aplicando un muestreo sistemático que cubriera la extensión de la playa, y mediante un recorrido en "V" contrapuestos (Sievers *et al.*, 2007) (Fig. 1). En cada punto de muestreo se delimitó un área de 10 cm de diámetro y 5 cm de profundidad (Santarém *et al.*, 1998; Cassenote *et al.*, 2011) para recolectar 500 g de arena en cada punto de muestreo, recopiladas entre las 7:30 am y 8:30 am; almacenadas en bolsas de plástico de cierre hermético para su transporte y procesamiento en el laboratorio en un periodo no mayor a 48 h.

Se procesaron un total de 10 muestras de arena por duplicado bajo las condiciones de estandarización de la técnica de Willis, empleando un control positivo que consistió en 10 g de arena contaminada con 400 h·g⁻¹ a partir de la suspensión de huevos de Anquilostomideos en SSF 0,85% sin preservantes.

-Validación de la Técnica estandarizada de Willis con muestras de suelo de la Comunidad Caño Pendare, municipio Cedeño, edo. Bolívar.

Se probó la técnica estandarizada de Willis en muestras de suelo de la comunidad indígena (de la etnia Piaroa) Caño Pendare, que presentó una prevalencia de helmintiasis intestinal de 30,5% en ese mismo año. Se realizó un muestreo intencional en los alrededores de cada vivienda de la comunidad (n=70), para reconocer el riesgo de contaminación parasitario del núcleo familiar, en el marco de una jornada de diagnóstico parasitológico llevado a cabo por la Fundación

Tierra Blanca. Cada punto de muestreo se estableció a 0 m, 10 m, 20 m de distancia con relación a la vivienda mediante un recorrido en línea recta (según lo permitido por la topografía) en dirección a zonas en la que los lugareños señalaban la deposición de materia fecal a cielo abierto. En cada punto de muestreo se delimitó un área de 10 cm de diámetro y 5 cm de profundidad (Santarém *et al.*, 1998; Cassenote *et al.*, 2011). Se procesaron 189 muestras de tierra de casas habitadas por duplicado bajo las condiciones óptimas determinadas en la estandarización de la técnica de Willis.

Esta comunidad está conformada por población indígena etnia Húatojja (Piaroas), en el municipio Manuel Cedeño del edo. Bolívar; a las riberas del Rio Parguaza. Las coordenadas corresponden a 6°06'02.8"N 67°04'01.6"W, abarcando una superficie total de 219.316,60 m².

Análisis de datos

La captación de la información se realizó en Microsoft Excel 2013 (Microsoft corporation®,1997). Se construyó una base de datos y se expresó en frecuencia la positividad o no para parásitos en las muestras procesadas de cada una de las condiciones ensayadas y de cada uno de los puntos de muestreo. Se aplicó un análisis de varianza con arreglo factorial para datos no paramétricos de Kruskal Wallis, registrando el número de huevos de helmintos en cada procedimiento y el porcentaje de recuperación parasitaria, a fin de conocer el mejor tratamiento (combinación de variables manipuladas por el investigador) para la técnica de Willis, donde las diferencias estadísticas de cada grupo se determinaron calculando el contraste múltiple de rangos. Se calculó la diferencia de dos proporciones muestrales considerando los porcentajes de recuperación de huevos de helmintos en las muestras controles de 400 y 800 h·g⁻¹ arena en el proceso de validación de la técnica, así como la diferencia entre los porcentajes de recuperación de cada especie parasitaria de la suspensión de geohelminthos empleada para la validación. Por último, se consideraron los resultados de recuperación parasitaria (en términos de porcentaje de recuperación y conteo absoluto de parásitos) obtenidos en las condiciones óptimas de estandarización y en las de validación con muestras controles, para el cálculo de la regresión lineal, a

fin de estimar la respuesta de la técnica de Willis ante concentraciones parasitarias diferentes a las probadas en la presente investigación.

Aspectos éticos

Los autores declaran que se cumplieron todos los aspectos éticos del país e internacionales.

RESULTADOS

Evaluación de las suspensiones de geohelmintos

En las pruebas pilotos se demostró que los preservantes usados en las suspensiones de huevos de geohelmintos generaban interferencias en la flotación de los huevos durante la ejecución de la técnica de Willis ($p = 0,00$). La suspensión de huevos de Anquilostomideos sin aditivos resultó más efectiva (Tabla 1), con un porcentaje de recuperación mínimo de 4,4% y un máximo de 82,5%, razón por lo que fue usada para el desarrollo del protocolo de estandarización de la técnica de Willis, con la precaución de realizar el procedimiento dentro de las 72 h siguientes, evitando la degradación de las formas parasitarias.

Estandarización de la Técnica de Willis

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación parasitaria obtenidos en los diversos tratamientos ($p = 0,00$) (Tabla 2, Fig. 1A). La contaminación de

10 g de arena con la suspensión de Anquilostomideos a una concentración de $400 \text{ h}\cdot\text{g}^{-1}$ (tratamiento 9) generó mayor porcentaje de recuperación en comparación al resto de los experimentos, con valores entre 67,8% y 82,5% de recuperación parasitaria, con una media de 77,3%. De igual manera se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según el número total de huevos recuperados ($p = 0,00$) (Tabla 2, Fig. 1B).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación de huevos tras las variaciones de concentración de huevos de Anquilostomideos empleadas en el proceso de estandarización ($p = 0,00$) (Tabla 2, Fig. 2A), siendo la concentración de $400 \text{ h}\cdot\text{g}^{-1}$ la de mayor porcentaje de recuperación, con una media de 66,0%; que corresponde con un promedio 1.494 huevos ($p = 0,00$) (Tabla 2, Fig. 2B).

Por su parte, no se obtuvieron diferencias entre los porcentajes de recuperación parasitaria de las serie de 1 g, 5 g y 10 g de arena contaminadas experimentalmente ($p = 0,63$), con 45,4%, 35,0% y 44,0% de recuperación respectivamente (Tabla 2, Fig. 2C). Estos resultados contrastan con las diferencias evidenciadas entre el número absoluto de huevos recuperados y las series de arena evaluada ($p = 0,0099$), donde la serie de 10 g registró el mayor promedio con 1.341 huevos de Anquilostomideos contabilizados (Tabla 2, Fig. 2D).

Tabla 1. Recuperación parasitaria según las suspensiones de geohelmintos evaluadas para la estandarización de la técnica de Willis.

Tipo de Suspensión	Especie parásita contenida	Total de huevos en el vial ($\text{h}\cdot\text{vial}^{-1}$)	Concentración parasitaria ($\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volumen final (mL)	Rango de recuperación parasitaria (%)
En formalina 10%	Huevos fértiles e infértiles de <i>A. lumbricoides</i>	555.750	37.050	15	0-8,1
En PBS	Huevos fértiles e infértiles de <i>A. lumbricoides</i>	800.000	20.000	40	0-0,6
En SSF sin preservantes	Huevos de Anquilostomideos	56.000	1.120	50	4,4-82,5

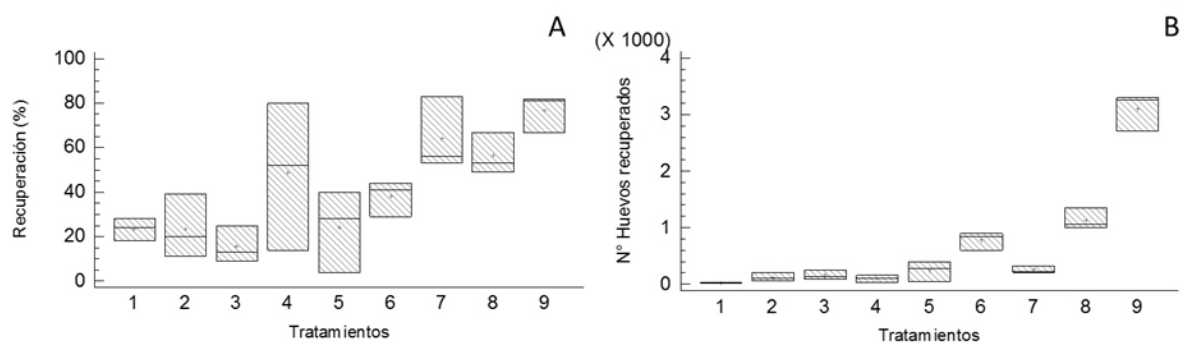


Figura 1. A. Porcentaje de recuperación de huevos geohelminths según tratamiento. B. Número de huevos recuperados según tratamiento.

Tabla 2. Tratamiento según cantidad de arena y huevos del parásito con muestras controles.

Tratamiento	Serie arena (g)	Concentración ($h \cdot g^{-1}$)	Nº huevos Adicionados	Promedio huevos recuperados	Promedio de porcentaje de recuperación (%)
1	1	100	100	23,33	23,33
2	5	100	500	119,00	23,80
3	10	100	1000	158,33	15,83
4	1	200	200	97,67	48,83
5	5	200	1000	242,67	24,27
6	10	200	2000	776,00	38,80
7	1	400	400	256,00	64,00
8	5	400	2000	1137,00	56,85
9	10	400	4000	3090,00	77,25

Tabla 3. Porcentaje de recuperación de huevos de geohelminths según la especie.

Especie	Proporción de arena contaminada (g)	Serie 400 $h \cdot g^{-1}$			Serie 800 $h \cdot g^{-1}$			P valor ($\alpha=0,05$)
		Nº huevos adicionados	Nº huevos recuperados	Porcentaje recuperación ($\chi \pm 2DE$)	Nº huevos adicionados	Nº huevos recuperados	Porcentaje recuperación ($\chi \pm 2DE$)	
<i>A. lumbricoides</i>	10	3734	2140	57,3 \pm 2,1	7476	3356	44,9 \pm 4,0	0,00
Anquilostomideos	10	178	118	66,1 \pm 6,7	356	336	94,4 \pm 9,9	0,02
<i>T. trichiura</i>	10	89	10	11,6 \pm 1,5	178	24	13,5 \pm 3,1	0,08
Total geohelminths	10	4000	2268	56,7 \pm 2,7	8000	3716	46,5 \pm 4,4	0,00

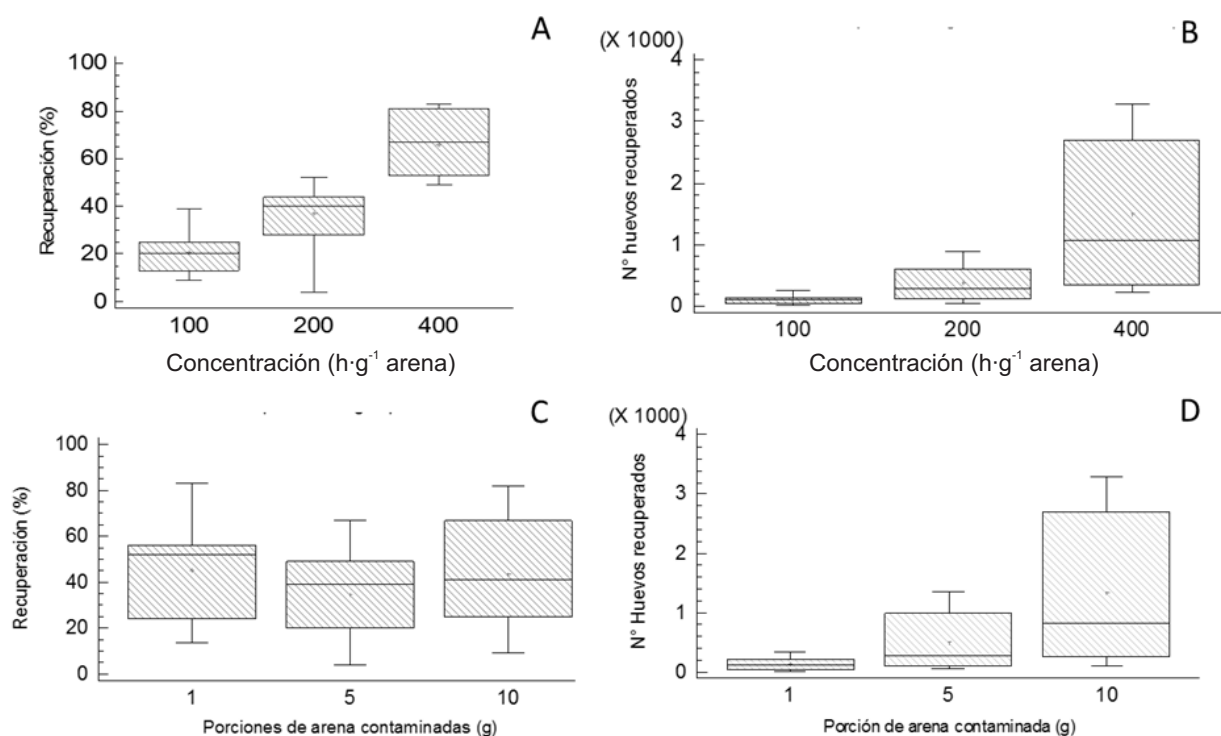


Figura 2. A. Porcentaje de recuperación parasitaria según concentración. B. Número de huevos recuperados según concentración. C. Porcentaje de recuperación parasitaria según serie arena. D. Numero de huevos recuperados según serie arena.

Validación de la Técnica de Willis

-Validación de la técnica estandarizada con muestras de arena de concentración parasitaria conocidas

La suspensión de Anquilostomideos sin preservantes presentó un conteo de 506.250 huevos·vial⁻¹ para una concentración de 4.500 h·mL⁻¹, conteniendo huevos fértiles e infértiles de *A. lumbricoides*, Anquilostomideos sp. y *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771), que fue utilizada para la contaminación experimental de muestras de arena en el proceso de validación. El porcentaje de recuperación de huevos de geohelminths de acuerdo a la especie, se resume en la Tabla 3.

-Validación de la Técnica estandarizada de Willis con muestras experimentales

El 100% de las muestras de arena de Playa Blanca procesadas siguiendo la técnica estandarizada resultaron negativas para formas parasitarias de importancia sanitaria, manteniéndose resultados

positivos en las muestras control. Sin embargo, se demostró la presencia de huevos de *A. lumbricoides* en 18,5% de 189 muestras analizadas de suelos de la comunidad Caño Pendare, Municipio Cedeño, edo. Bolívar; correspondiendo 48,6% de las muestras positivas a suelo arcillosos y 51,4% a suelos rocosos.

No se consiguió relación lineal entre porcentaje de recuperación y la concentración de la suspensión de huevos geohelminths empleada para la contaminación experimental de 10 g de arena de playa ($r = 0,18$; $p = 0,16$). Por su parte, se obtuvo una regresión lineal significativa entre el número de huevos recuperados y la concentración de la suspensión de huevos geohelminths empleada para la contaminación experimental de 10 g de arena de playa ($r = 0,82$; $p = 0,00$), que se explica mediante la fórmula lineal: N° huevos recuperados = $8,28 + 5,13 \cdot \text{Concentración (h} \cdot \text{g}^{-1} \text{ arena procesada)}$.

DISCUSIÓN

Los huevos de *A. lumbricoides* de las suspensiones de formalina al 10% y PBS que se obtuvieron a partir de la disección de hembras adultas preservadas durante largo tiempo en formalina al 10%, no fueron exitosas para la recuperación de huevos de geohelminthos por la técnica de flotación de Willis. La formalina genera puentes cruzados con los grupos amino, carboxilo e indol de las proteínas, dando lugar a fuertes uniones entre moléculas proteicas, con gran poder endurecedor; por lo que aquellas células que se mantienen por largo tiempo fijados con formalina 10% presentan variación de dimensiones orgánicas, afectando peso y medida de huevos de helmintos y por ende la densidad, afectando su flotación en la técnica de Willis durante la estandarización (Duque & Díaz, 1999).

Investigaciones anteriores emplearon gusanos adultos de helmintos intestinales viables a partir de una deposición fecal recién emitida (Santarém *et al.*, 2009) o provenientes de autopsias de canes (Oge & Oge, 2000). Resultó un gran reto obtener una muestra fecal fresca con una alta carga parasitaria de geohelminthos que permitiera realizar una suspensión de suficiente volumen y concentración parasitaria para cumplir con el protocolo de estandarización. El vial resultante con huevos de Anquilostomideos en suspensión en SSF al 0,85% demostró presentar mayor nivel de recuperación ($p = 0,00$), por lo que fue seleccionada para la realización de la estandarización de la técnica de flotación de Willis. Tomando en cuenta que los huevos de Anquilostomideos son frágiles y tienden a eclosionar rápidamente (Brooker *et al.*, 2015), se realizó el procedimiento experimental durante las siguientes 72 h de haber elaborado dicha suspensión, manteniéndola refrigerada a 4°C durante todo el proceso.

Todas las muestras de arena contaminadas resultaron positivas para la técnica de Willis durante la estandarización; evidenciando su efectividad, considerando que con observar una sola forma parasitaria se demuestra el riesgo de infección en suelos de zonas recreacionales. Además, el promedio del porcentaje de recuperación parasitaria en la técnica

estandarizada de Willis (77,3%) superó a lo reportado por Oge & Oge (2000), en la que obtuvo 14,6% de recuperación de huevos de *Toxocara* spp. por la técnica de centrifugación y flotación descrita por Dunsmore *et al.* (1984). En este sentido, Pérez & Raña (2016), resaltan que la técnica de Willis les permitió la recuperación de más huevos de helmintos que la técnica de sedimentación-flotación, en todas las soluciones de flotación probadas en su investigación.

Algunas investigaciones (Quinn *et al.*, 1980; Kazacos, 1983; Dunsmore *et al.*, 1984; Sievers *et al.*, 2007; Pérez & Raña, 2016) sugieren realizar un paso previo a la realización de la técnica de flotación, que consiste en el lavado de las muestras con algún detergente aniónico (Tween 20 o Tween 80) con el fin de reducir la tensión superficial de los líquidos permitiendo una mejor disgregación de las partículas que facilitaría la detección de huevos en las muestras de suelo. Sin embargo, el proceso de filtración que sigue luego de lavados con detergente aniónico, pudiera generar pérdidas de huevos de helmintos en la muestra de suelo (Santarém *et al.*, 2009), y además se ha demostrado que los terrenos arenosos presentan menos variación en el porcentaje de recuperación, ya que sus partículas mantienen a los huevos más sueltos facilitando su flotación (Dubin *et al.*, 1975; Oge & Oge, 2000). Dado a que la arena de las playas de Puerto Cabello está compuesta por gránulos muy finos y los componentes orgánicos tales como troncos, ramas o piedras fueron fácil y manualmente extraídos del *pool* de muestras de arena que fue esterilizada para la contaminación experimental, no fue necesario realizar lavados previos, por lo que la ejecución de la técnica de flotación resultó un proceso de un solo paso.

Las condiciones óptimas de trabajo se lograron empleando 10 g de arena contaminadas a concentraciones iguales a $400 \text{ h} \cdot \text{g}^{-1}$. La visualización microscópica de las láminas del proceso de Willis resultó fácil de realizar, con campos relativamente limpios de detritus e impurezas y donde las pocas partículas de arena presentaron una distribución uniforme que facilitó la identificación de las formas parasitarias. Tal como se describen en otros análisis (Oge & Oge, 2000; Pérez & Raña, 2016), se realizó la visualización de dos láminas por cada muestra de arena procesada a intervalos de 20 min cada una,

para incrementar la posibilidad de recuperación parasitaria.

En relación a la cantidad de arena recomendada para ser procesada por la técnica de flotación simple de Willis existe mucha discrepancia; pudiendo variar desde 100 g (Devera *et al.*, 2008, 2015); 50 g (Milano & Oscherov 2002; Cazorla *et al.*, 2007; Apóstol *et al.*, 2013; Pérez & Raña, 2016), 20 g (Guerrero *et al.*, 2015) y hasta un mínimo de 10 g de arena (Nunes *et al.*, 2000). La estandarización de la técnica de Willis se diseñó a una escala que permitiera el fácil procesamiento de las muestras, considerando los implementos de laboratorio disponibles y cuyos resultados permitieran su comparación con las variaciones de porciones de arena referenciadas, obteniendo como resultado que la proporción de arena no tiene influencia directa en la mayor probabilidad de recuperación de formas parasitarias ($p = 0,63$), sino que depende de la concentración de huevos de geohelminthos que puedan estar esparcidos en una extensión de terreno dada ($p = 0,00$). Así también lo demostró Oge & Oge (2000), mediante técnica de flotación descrita por Dunsmore *et al.* (1984) y Kazacos (1983) durante la contaminación experimental de 50 g de arena con huevos de *Toxocara* spp, y Pérez & Raña (2016) resaltan que la recuperación parasitaria está influida por el grado de contaminación de las muestras de arena y en algunos casos por la soluciones de flotación utilizada.

En el proceso de validación se evidenció un nivel de recuperación de huevos de geohelminthos significativamente mayor en las muestras contaminadas a una concentración de $400\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$ arena ($p = 0,00$) en relación a la de $800\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$ arena, debido a que en ésta última se generó la flotación de numerosos huevos de geohelminthos, que dificultó el conteo meticuloso, tomando en cuenta que la visualización de la preparación en el microscopio óptico debe realizarse rápidamente, para prever la evaporación de la solución con la consecuente formación de precipitados de cristales de cloruro de sodio que impiden la adecuada identificación parasitaria.

Para la selección de la técnica parasitológica se debe considerar, entre otras cosas, las formas parasitarias que esperan encontrarse. Así, las comparaciones entre técnicas coproparasitológicas

existentes han determinado que Willis es particularmente útil en la detección de huevos de Anquilostomideos en muestras fecales (Nuñez 1991; Navone *et al.*, 2005), en virtud de que estos huevos miden aproximadamente entre $56\text{-}75\ \mu\text{m}$ por $34\text{-}57\ \mu\text{m}$, con una gravedad específica (GE) de 1,06, mientras que los huevos de *A. lumbricoides* presentan una GE entre 1,09 y 1,10 según sus variaciones en tamaño, evolución y condición de fertilidad (David & Lindquist, 1982). Es por ello que la técnica estandarizada resultó ser mucho más eficiente para los huevos de Anquilostomideos (66,1% a 94,4%), que coincide e incluso supera el obtenido en la estandarización (60% a 80%), mientras que los huevos de *A. lumbricoides* manifestaron un porcentaje ligeramente inferior a lo estandarizado (57,3%-44,9%) y los huevos de *T. trichiura* registraron el menor nivel de recuperación (11,6%-13,4%).

Por ello, la técnica estandarizada de Willis es particularmente útil para la detección del riesgo de transmisión de Larva Migrans Cutánea (LMC) en playas de Venezuela, donde se presentan climas cálidos, suelos arenosos y de alta humedad (>80%); condiciones favorables para la sobrevida de Anquilostomideos (Plascencia, 2013), y cuya contaminación ambiental fue demostrada por Guerrero *et al.* en Playa Blanca en el 2014 y Guerrero *et al.* (2015) en Playa Quizandal, ambas en el Municipio Puerto Cabello. Sin embargo, durante el proceso de validación de la técnica estandarizada en Playa Blanca no se observaron formas parasitarias, lo que parece indicar que en el momento del muestreo los niveles de contaminación parasitaria fueron mínimos (no detectables). No obstante, el muestreo de suelos en la comunidad indígena Caño Pendare de la etnia Piaroa, que presentó una prevalencia helmintiasis intestinal de 30,5% en ese mismo año; demostró que la técnica de Willis estandarizada es válida para muestras de suelo a pesar de la diversidad de características geológicas, cuando la fuente de contaminación ambiental con materia fecal es constante.

La correlación lineal encontrada entre el número de huevos contabilizados y la concentración parasitaria de la suspensión empleada para la contaminación experimental de porciones de arena de playa ($r = 0,82$; $p = 0,00$) indica que no hay otros elementos interferentes, donde el 82,76% de las

variaciones del número de huevos de geohelminthos recuperados se debe al número de huevos añadidos durante la contaminación experimental y no al azar. Lógicamente, el mínimo conteo de huevos que es posible recuperar es un huevo de geohelminthos, cuya probabilidad de detección no se pudo explicar a través de una relación lineal entre el porcentaje de recuperación parasitaria según la concentración de huevos de la suspensión empleada ($p = 0,16$), demostrando que la probabilidad de detección de huevos por la técnica estandarizada no solo depende de la concentración de parásitos en las porciones de arena procesadas, sino de la homogeneidad de distribución parasitaria en el medio ambiente, por lo cual la positividad de la técnica también se ve influida por la metodología de muestreo (Sievers *et al.*, 2007), de la frecuente exposición a agentes contaminantes y de variaciones climáticas, por lo cual se recomienda realizar muestreos frecuentes y en diferentes períodos del año (ya que el factor climático y exposición humana y canina también influyen), para incrementar la probabilidad de detección parasitaria.

La técnica estandarizada de Willis por si misma resultó efectiva para la recuperación de huevos de geohelminthos, empleando una solución de cloruro de sodio de fácil preparación y bajo costo, mediante un procedimiento técnico sencillo y rápido, siendo apropiada para estudios de prevalencia donde se requiere analizar un gran número de muestras y abarcar gran extensión de terreno. Se recomienda la visualización microscópica de al menos dos láminas portaobjetos con el material resuspendido por cada porción de arena analizado, ya que esto incrementa el número de huevos que son recuperados y contabilizados durante la evaluación sanitaria del suelo muestreado.

Además, se sugiere la aplicación de la técnica de sedimentación espontánea conjuntamente con la técnica de Willis estandarizada durante las evaluaciones sanitarias de suelos de zonas recreacionales, a fin de aumentar el rango de detección de todos los estadios evolutivos y para las diversas especies parasitarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apóstol, P, Pasceri, P & Javitt, M. 2013. *Detección de huevos de Toxocara sp. en suelos de tres parques públicos de la zona este de Barquisimeto, estado Lara*. Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara, vol. 5, <http://revistacmvl.jimdo.com/suscripci%C3%B3n/volumen-5/toxocara/>.
- Bojanich, MV, Alonso, JM, Caraballo, NA, Itati-Scholler, M, Lopez, M, Garcia, LM & Basualdo, JA. 2015. *Assessment of the presence of Toxocara eggs in soils of an arid area in central-western Argentina*. Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, vol. 57, pp. 73-76.
- Brooker, S, Nikolay, B, Balabanova, D & Pullan, R. 2015. *Global feasibility assessment of interrupting the transmission of soil-transmitted helminths: a statistical modelling study*. Lancet Infection Disease, vol.15, pp. 941–950.
- Cáceres, A, Gonçalves, F, Cazorla, I & Carvalho, S. 2004. *Contaminação do solo por helmintos de importância médica na Praia do Sul (Milionários), Ilhéus – Ba*. NewsLab, vol.67, pp.146-155.
- Cassenote, A, Pinto, J, De Abreu, A & Ferreira, A. 2011. *Contaminacao do solo por ovos de geo-helminthos com potencial zoonotico na municipalidade de Fernandopolis, Estado de Sao Paulo, entre 2007 e 2008*. Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical, vol. 44, pp. 371-374.
- Cavalcante, A & Gagliani, LH. 2011. *Estudo da prevalência de enteroparasitas em areia de praia no município de São Vicente – SP – Brasil*. Revista UNILUS Ensino e Pesquisa, vol. 8, pp. 5-19.
- Cazorla, D, Morales, P & Acosta, M. 2007. *Contaminación de suelos con huevos de Toxocara spp. (nematoda, ascaridida) en parques públicos de la ciudad de Coro, Estado Falcón, Venezuela*. Revista Científica FCV-LUZ, vol. 17, pp.117-122.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). 2002. *Resolução nº 274. Brasil*. [Publicación N. 18, 25 de enero 2001, sección 1 (70-71)]. <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/r>

- es_conama_274.pdf.
- David, ED & Lindquist, WD. 1982. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. *Journal Parasitology*, vol. 68, pp. 916-919.
- De Oliveira, A, Batista, H, de Freitas, N, Castro, T & de Sousa, F. 2011. *Frequência de enteroparasitas nas areias das praias da Paraíba*. *Revista de Biología y Farmacia*, vol. 6, pp. 108-113.
- Devera, R, Blanco, Y, Hernández, H & Simoes, D. 2008. *Toxocara spp. y otros helmintos en plazas y parques de Ciudad Bolívar, estado Bolívar (Venezuela)*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 26, pp. 23-26.
- Devera, R, Tutaya, R & Devera-Velásquez, R. 2015. *Aislamiento de huevos y larvas de Toxocara spp. y otros geohelminthos en suelos de parques de un colegio de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela*. *Saber*, vol. 27, pp. 341-346.
- Dunsmore, JD, Thompson, RCA & Bates, IA. 1984. *Prevalence and survival of Toxocara canis eggs in the urban environment of Perth, Australia*. *Veterinary Parasitology*, vol. 16, pp. 303-311.
- Duque, P & Díaz, J. 1999. *El Formol: su génesis, normas, aplicaciones e incidencia sobre la salud humana*. *Universidad Pontificia Bolivariana*, vol. 18, pp. 35-46.
- Dubin, S, Segall, S & Martindale, J. 1975. *Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including Toxocara canis: A preliminary study*. *American Journal of Public Health*, vol. 65, pp. 1242-1245.
- Guerrero, A, Quiñones, M, Sequera, E & Marín, J. 2014. *Parásitos patógenos en arena de playa y su relación con condiciones ambientales, en un balneario de Puerto Cabello, Venezuela 2012-2013*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, vol. 54, pp. 150-158.
- Guerrero, A, Rodríguez, M & Román, J. 2015. *Enteroparásitos en arena de playa como indicadores de contaminación fecal y su relación con condiciones ambientales en playa Quizandal, Puerto Cabello, marzo 2013 enero 2014*. *Vitae*, vol. 63, http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_5162.pdf.
- Hassan, A. & Oyebamiji, D. 2018. *Intensity of soil transmitted helminths in relation to soil profile in selected public schools in Ibadan metropolis*. *Journal Epidemiology Infectious Diseases*, vol. 1, pp. 73-78.
- Kazacos, KR. 1983. *Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies*. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 44, pp. 896-900.
- Mandarino-Pereira, A, Silva, F, Wilson, C, Lopes, G & Pereira, M. 2010. *Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests*. *Veterinary Parasitology*, vol. 170, pp. 176-181.
- Milano, A & Oscherov, E. 2002. *Contaminación por parásitos caninos de importancia zoonótica en playas de la ciudad de Corrientes, Argentina*. *Parasitología Latinoamericana*, vol. 57, pp. 119-122.
- Ministerio del Poder Popular para el Ambiente (MPPA). 2006. *Ley Orgánica del Ambiente*. *Gaceta oficial N° 5.883*. Extraordinario del 22 de diciembre de 2006 de la República Bolivariana de Venezuela. 2006. Caracas.
- Ministerio del Poder Popular para el Ambiente (MPPA). 2002. *Normas para la clasificación y el control de la calidad en los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos*. [Decreto N°883. *Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5.021 18 de diciembre de 2002*], Caracas.
- Ministerio del Poder Popular para la Defensa (MPPD). 2015. *Carta Náutica del Servicio de Hidrografía y Navegación de la República Bolivariana de Venezuela*. <http://www.dhn.mil.ve/images/CATSHN2013.pdf?ml=5&mlt=>.
- Montalvo-Sabino, E, Cipriano-Fonseca, F, Marcelo-Andrade, E, Rosas-Jara, DM, Mines-Huaman, WM, Capcha-Tucto, LN, Chavez-Chavez, C, Benites-Mendoza, B, Sandoval-Tolentino, M, Pineda-Castillo, CA, Cárdenas-Callirgos, J, Wetzel, EJ & Iannacone J. 2014. *Factors associated with contamination of public parks (Huánuco, Perú) by Toxocara canis eggs and other endoparasites of zoonotic importance*. *Neotropical Helminthology*, vol. 8, pp. 259-268.
- Navone, GT, Gamboa, MI, Kozubsky, LE, Costas, ME, Cardozo, MS, Sisliauskas, MN, &

- González M. 2005. *Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico*. Parasitología Latinoamericana, vol. 60, pp. 178–181.
- Nunes, C, Pena, C, Negrelli, G, Anjo, C, Nakano, M & Stobbe, N. 2000. *Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil*. Revista Saúde Pública, vol. 34, pp. 656-658.
- Nunes, C, Sinhorini, I & Ogassawara, S. 1994. *Influence of soil texture in the recovery of Toxocara canis eggs by a flotation method*. Veterinary Parasitology, vol. 53, pp. 269-274.
- Nuñez, F. 1991. *Comparación de varias técnicas coproparasitológicas para el diagnóstico de geohelmintiasis intestinal*. Revista do Instituto Medicina Tropical do Sao Paulo, vol. 33, pp. 403-406.
- Oge, H & Oge, S. 2000. *Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of Toxocara canis in samples of sand*. Veterinary Parasitology, vol. 92, pp.75-79.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2019. *Helmintiasis transmitidas por el suelo*. Nota descriptiva. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>.
- Pérez, A & Raña, M. 2016. *Evaluación de métodos para recuperación de formas inmaduras de nemátodos de importancia zoonótica en arena de playa de Montevideo*. Tesis de grado de Medicina Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay.
- Plascencia, A. 2013. *Larva migrans cutánea relacionada con Ancylostomas*. Dermatología Revista Mexicana, vol. 57, pp. 454-460.
- Quinn, R, Smith, HV, Bruce, RG & Girdwood, RWA. 1980. *Studies on the incidence of Toxocara and Toxoscaris spp. ova in the environment. A comparison of flotation procedures for recovering Toxocara spp. ova from soil*. Journal of Hygiene (London), vol. 84, pp. 83–89.
- Santarém, V, Sartor, I & Bergamo, F. 1998. *Contaminação por ovos de Toxocara spp. de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 31, pp. 529-532.
- Santarém, V, Rubinsky- Elefant, G, Fabris, P & Chagas, F. 2009. *Toxocaríases canina e humana*. Veterinaria y Zootecnia, vol. 16, pp.437-447.
- Sievers, G, Concha, C & Gädicke, P. 2007. *Prueba de una técnica para recuperar huevos de Toxocara canis de muestras de tierra*. Parasitología latinoamericana, vol. 62, pp. 61-66.
- Tavalla, M, Oormazdi, H, Akhlaghi, L, Razmjou, E, Moradi-Lakeh, M, Shojaee, S, Hadighi, R & Meamar, AR. 2012. *Prevalence of parasites in soil samples in Tehran public places*. African Journal of Biotechnology, vol. 11, pp. 4575-4578.
- United State Environment Protection Agency (USEPA). 2000. *Beaches Environmental Assessment and Coastal Health Act of 2000*. <https://www.epa.gov/beach-tech/beach-act-2000>.
- Willis, H. 1921. *A simple levitation method for the detection of hookworm ova*. Medical Journal of Australia, vol. 2, pp. 375-376.
- Ziegelbauer, K., Speich, B, Mäusezahl, D, Bos, R & Keiser, J. 2012. *Effect of Sanitation on Soil-Transmitted Helminth Infection: Systematic Review and Meta-Analysis*. PLOS Medicine, vol. 9, e1001162.

Received January 10, 2020.

Accepted March 18, 2020.