

**AISLAMIENTO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN MUESTRAS DE AGUA AMBIENTALES.**

**Biglieri M, Magistrello P, Abete S, Fernández J, Kozubsky L, Costas ME, Cardozo M.**

**Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - 47 y 115.**

**Tel: +54 221 423533 int.58 - [paulamagistrello@yahoo.com.ar](mailto:paulamagistrello@yahoo.com.ar)**

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos anfitriónicos cosmopolitas que se encuentran en gran diversidad de hábitats. Nuestro trabajo propuso determinar la presencia de AVL en muestras de agua ambientales. Se recogieron en recipientes estériles 2 muestras superficiales de: laguna del Aeroclub La Plata (A1-A2), Lago del Bosque (B1-B2), Parque Saavedra (S1-S2); Río de la Plata (Punta Lara) (R1-R2) y lago de la República de los Niños (L1-L2). Se decantaron 24 hs, con los sedimentos se realizaron exámenes directos (ED) y cultivos en agar no nutritivo (Medio de Page) cubierto con película de *Escherichia coli*. Cada muestra se incubó a 37 y 42°C y se examinó cada 24 hs durante 15 días antes de considerarse negativa. En caso de desarrollo se repicaron y colorearon con Giemsa. Se desarrollaron a 42°C, se realizó el ensayo de exflagelación para determinar presencia de AVL del género *Naegleria*. A excepción de las muestras L1 y L2, hubo desarrollo amebiano del género *Acanthamoeba* en todas las placas a 37 °C. Hubo desarrollo en 2 placas a 42° C (A1 y A2) con exflagelación positiva para A1 (género *Naegleria*) y negativa para A2 (género *Acanthamoeba*). Sólo B2 arrojó resultado positivo al ED. La presencia de AVL en aguas recreacionales debe alertar sobre la posibilidad de riesgo sanitario pues algunas especies pueden ocasionar meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis granulomatosa y queratitis amebiana.

**Introducción**

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas que se encuentran en ambientes húmedos como el suelo, el agua y el aire. (1)

En determinadas condiciones, pueden también comportarse como protozoarios parásitos (endoparásitos), tanto del ser humano como de otros mamíferos, por lo que se consideran organismos anfitriónicos. (2)

Se ha establecido que las amebas de vida libre producen en el hombre enfermedades de curso diverso; como cuadros del SNC agudos y fatales con componentes de predominio necrótico hasta enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa, amebiosis cutánea, queratitis, etc. (3) (4)

La infección por AVL se diferencia de otras porque estos protozoos se encuentran distribuidos en la biosfera, son muy virulentos, existen errores en su diagnóstico y es difícil establecer un tratamiento oportuno y efectivo. (1)

Existen cinco géneros reconocidos como causantes de patología en humanos: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y recientemente *Sappinia* y *Hartmanella*. (1)

**Género *Naegleria***

El ciclo de vida de *Naegleria fowleri* incluye una forma vegetativa o trofozoíto, un estado flagelado y uno quístico. Los trofozoítos corresponden a protozoos ameboides; cuyo movimiento, se realiza a través de pseudópodos redondeados, o lobopodios. En los tejidos infectados se encuentran formas trofozoíticas. La forma flagelada se observa en el ambiente o en medios acuosos en el laboratorio; esta forma puede reconvertirse a trofozoíto. Los quistes son esféricos, no se observan en los tejidos infectados. Como respuesta a condiciones ambientales adversas los trofozoítos se enquistan, esto se produce en el agua y en los medios de cultivo, pero no en los tejidos. Los quistes son altamente susceptibles a la desecación y se destruyen rápidamente en condiciones de sequedad. En un ambiente propicio -fresco, acuoso y de alta temperatura ocurre el desenquistamiento. (3)

*N. fowleri* es un protozoo ubicuo y presente en todo el mundo. Ha sido encontrado, bajo condiciones normales y temperatura ambiente, en el suelo, polvo del aire ambiental, agua dulce de piscinas y lagos, reservorios de agua doméstica, sistemas de humidificación, aguas residuales y en fosas nasales de individuos sanos. También se desarrolla bien en climas tropicales y temperaturas entre 40 °C y 45 °C, en aguas termales naturales limpias y contaminadas y aguas cloradas de piscinas templadas. (3)

Produce la llamada meningoencefalitis amebiana primaria, un cuadro agudo fulminante que afecta a personas saludables, con antecedentes de haber realizado deportes acuáticos en piscinas, estanques o ríos en los 3 a 7 días previos. Los protozoos penetran a través del neuroepitelio olfatorio originando una meningoencefalitis necrosante y purulenta, con compromiso predominante de la base del cerebro, tronco cerebral y cerebelo. (5)

#### **Género *Acanthamoeba***

El ciclo de vida de las diferentes especies de acantamebas presenta una forma vegetativa o trofozoíto y una forma quística, que es la de resistencia en el ambiente. El quiste está rodeado de una doble pared: una externa que puede ser ondulada o lisa y una interna que puede tener forma estrellada, poliedrica o esférica. Estas paredes se fusionan en determinadas zonas formando los ostíolos, que representan la puerta de salida del trofozoíto, cuando las condiciones medioambientales y nutricionales aseguran subsistencia y reproducción para el trofozoíto. (6)

En preparaciones frescas, los trofozoítos ameboides de las diferentes especies son irregulares y presentan múltiples proyecciones pseudopodiales retráctiles, filamentosas o espinosas llamadas acantopodios. (3)

Las acantamebas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se han aislado de enfriadores de agua, filtros de acondicionadores de aire, agua de mar, agua de charcos, aguas residuales, lagunas, ríos, polvo, soluciones de lavado ocular, incluso de la boca y de la nariz de individuos sanos. (3) Los quistes son extremadamente resistentes a la desecación, a los cambios de temperatura, a los agentes químicos utilizados en el tratamiento de las aguas de consumo e incorporados en los líquidos de lavado de las lentes de contacto. También son difíciles de eliminar aun con las biguanidas utilizadas para el tratamiento de la queratitis amebiana (QA). Esta resistencia puede deberse a la doble pared que lo recubre. También son muy resistentes a las bajas temperaturas y a la desecación, llegando a conservar su viabilidad por más de 20 años a 4°C. (7) Las temperaturas superiores a 60°C, durante 10 minutos, eliminan tanto los quistes como los trofozoítos. (6)

Varias especies del género *Acanthamoeba*, por ejemplo *A. castellani*, *A. culbertsoni*, *A. astronixis*, *A. polyphaga*, son agentes oportunistas y causan el cuadro denominado encefalitis amebiana granulomatosa, que afecta naturalmente a pacientes inmunocomprometidos. A pesar del nombre de encefalitis granulomatosa, el componente granulomatoso suele ser irrelevante o estar ausente y, en general, se manifiesta como una encefalitis necrosante y hemorrágica aguda, subaguda o crónica, multifocal con angeítis necrótica, algunas células macrofágicas y células gigantes multinucleadas, con presencia de trofozoítos y quistes parasitarios característicos. La puerta de entrada suele ser el tracto respiratorio o la piel desde donde, siguiendo la vía hematógona, las amebas llegan al SNC. Algunas especies del género *Acanthamoeba* originan, también, una queratitis crónica ulcerada uni o bilateral asociada, habitualmente, al uso de lentes de contacto, siendo la mayoría de las veces la fuente de infección la mala conservación, almacenamiento y limpieza de éstos. (5), (8), (9), (10), (11). Los síntomas mas comunes son dolor, fotofobia, pérdida de la visión, y ante un examen ocular se observa un infiltrado corneal en forma de anillo característico. (9), (10). Se han descrito casos de amebiosis cutánea, consistente en lesiones ulcerosas, nódulos, etc., principalmente en pacientes HIV positivos. (9)

#### ***Ballamuthia mandrillaris***

*Ballamuthia mandrillaris* es la única especie del genero *Ballamuthia* patógena para el hombre y los animales.

El ciclo de vida presenta una forma vegetativa o trofozoíto y una forma quística. Los trofozoítos se desplazan mediante proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodios. (3)

*B. mandrillaris* no había sido aislada del ambiente, solamente se había recuperado de muestras de autopsia de humanos y animales infectados, pero recientemente se ha publicado el aislamiento de esta AVL del ambiente en un entorno asociado a un caso de encefalitis. (3). Afecta tanto a individuos inmunocompetentes como a inmunocomprometidos. (9)

Es un agente oportunista y produce cuadros de encefalitis amebiana granulomatosa similares a los producidos por *Acanthamoeba* sp. (5)

Para su aislamiento se requieren cultivos celulares en monocapa de células de riñón de mono, fibroblastos.

#### **Género *Sappinnia***

*Sappinnia diploidea* se considera como un organismo potencialmente patógeno para el hombre, aunque hasta el momento se ha registrado un solo caso de encefalitis.

El ciclo de vida comprende una forma trofozoítica y una forma quística. La primera es relativamente grande comparada con otras AVL. Tiene pseudopodos poco definidos con una superficie que se retrae al moverse la ameba. El dato morfológico distintivo es la presencia de dos núcleos unidos. En la fase quística se observa igualmente una etapa binucleada. Se las ha denominado también organismos coprozoicos porque han sido aislados a partir de heces. Los quistes no se afectan con la acidez del estómago ni por las actividades

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

emulsificantes de la bilis; su presencia en el tubo digestivo no es indicativa de infección. Cuando los quistes están ya en las heces, que contienen abundantes nutrientes bacterianos, inician su proceso de desenquistamiento. (2)

No es clara la ruta de entrada, pero se supone que es por diseminación hematológica al inhalar quistes o trofozoítos. (1)

#### **Objetivo**

Determinar la presencia de AVL en muestras de agua ambientales empleadas con fines recreacionales.

#### **Materiales y métodos**

Se obtuvieron 10 muestras ambientales: 2 de la laguna del Aeroclub La Plata, 2 del Lago del Bosque, 2 del Río de La Plata (Punta Lara), 2 del lago de la República de los niños y 2 del Parque Saavedra, todas de la superficie. Las mismas fueron colectadas en frascos estériles de 500 ml.

Se les midió el pH y se las dejó sedimentar 24 hs.

Una vez cumplido el tiempo se descartó el sobrenadante, se tomaron 15 ml que se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min, se descartaron 13 ml del sobrenadante, se resuspendió el sedimento con pipeta Pasteur estéril,

se efectuó la siembra y la observación microscópica directa.

Las placas se sembraron por duplicado para cultivar a 37 °C y a 42 °C ya que las especies del género *Naegleria* son termorresistentes. Para ello se retiraron las placas con ágar no nutritivo de la heladera, se dejaron a 37° C durante 30 minutos.

De un cultivo en medio sólido de *Escherichia coli* de 18-24 hs (12) se tomó material con ansa, se transfirió a un tubo estéril conteniendo 0.5 ml de Solución de PAGE y se emulsionó. Se cubrió la superficie del ágar con una película de esa emulsión.

Se sembraron 0.5 ml del sedimento en el centro de la placa marcando exactamente el área de siembra y se incubó a 37 °C y 42 °C

Las muestras fueron denominadas como se indica a continuación:

Bosque 1 (B1)
Bosque 2 (B2)
Aeroclub 1 (A1)
Aeroclub 2 (A2)
P. Saavedra 1 (S1)
P. Saavedra 2 (S2)
Río (Punta Lara)1 (R1)
Río (Punta Lara) 2 (R2)
República de los niños 1 (L1)
República de los niños 2 (L2)

Para la lectura se revisó cada placa diariamente al microscopio con aumento de 4X.

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

En los casos donde se observó una imagen compatible con quistes de AVL, se cortó el ágar en el área de sospecha con bisturí estéril y se lo sembró en forma invertida en una nueva placa para la observación temprana de trofozoítos.

Alícuotas del material se observaron microscópicamente en preparaciones húmedas y/o con tinciones permanentes.

La morfología de los quistes fue determinada por observación directa de las placas y coloración de Giemsa en extendidos finos.

Se determinó la movilidad de los trofozoítos tomando muestras con ansa de las placas, resuspendiendo con agua destilada y efectuando observaciones microscópicas entre porta y cubreobjetos.

Para considerar a los cultivos como negativos, fueron observados durante 15 días consecutivos.

El cultivo fue considerado positivo cuando se observaron trofozoítos y/o quistes informándose sólo el género. (12)

A las muestras que resultaron positivas a 42°C, que posiblemente correspondieran a especies del género *Naegleria*, se les realizó la prueba de exflagelación que consistió en efectuar una suspensión en 1 ml de agua destilada con trofozoítos, dejarlos 1 hora a temperatura ambiente y luego observar entre porta y cubreobjetos a 4X la posible emisión de flagelos.

Reactivo 1.-Solución de Page:				Reactivo 2.- Agar no nutritivo:	
NaCl	120 mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142 mg	Solución de Page	100 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mg	Agar	1,5 gs
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4 mg	H <sub>2</sub> O destilada	csp 1000 ml		

#### **Resultados**

Los resultados como se observa en la tabla 1 fueron positivos para 8 muestras a 37 °C y para dos muestras a 42 °C.

A la muestra A1 a 42°C se le realizó la prueba de exflagelación, resultando ésta positiva con lo que se puede afirmar que la especie presente pertenece al género *Naegleria*.

La muestra A2 a 42 °C resultó negativa para la prueba de exflagelación, por lo que se descartó el género *Naegleria*, pero existen especies del género *Acanthamoeba* que crecen a dicha temperatura.

Las muestras a 37 °C fueron todas positivas excepto L1 y L2 cuyo pH era francamente alcalino. La morfología de los quistes y de los trofozoítos desarrollados era compatible con amebas del género *Acanthamoeba* (Fotos 1 y 2).

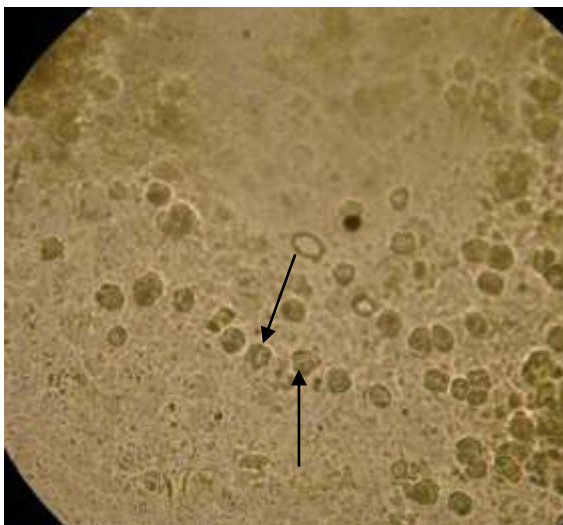


Foto 1: se observan quistes de *Acanthamoeba* spp.

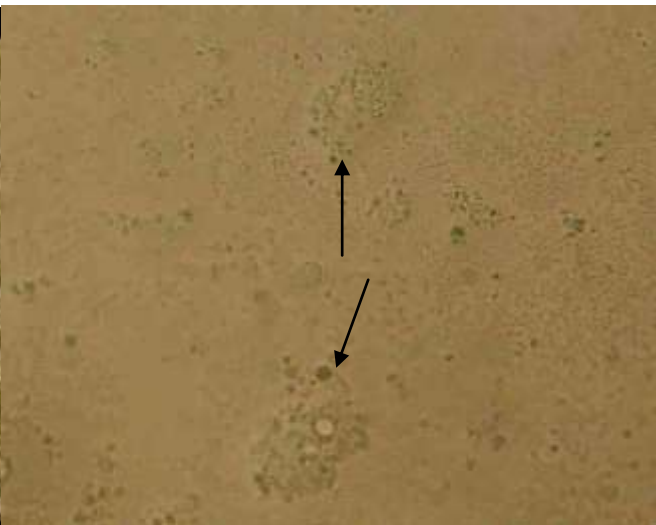


Foto 2: se observan trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

En la muestra A1 donde hubo crecimiento a 37 °C y 42 °C y presentó asimismo exflagelación se encontraron amebas de ambos géneros: *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

**Tabla 1:**

Descripción de muestras, pH, condiciones de cultivo y observaciones

	pH	Observación Directa	37°C	42°C	Exflagelación
<b>Bosque 1 (B1)</b>	7.0	-	+	-	
<b>Bosque 2 (B2)</b>	6.5	+	+	-	
<b>Aeroclub 1 (A1)</b>	6.0	-	+	+	+
<b>Aeroclub 2 (A2)</b>	6.0	-	+	+	-
<b>P.Saavedra 1 (S1)</b>	7.0	-	+	-	
<b>P.Saavedra 2 (S2)</b>	7.0	-	+	-	
<b>Río (Punta Lara) 1 (R1)</b>	7.0	-	+	-	
<b>Río (Punta Lara) 2 (R2)</b>	7.0	-	+	-	
<b>República de los niños 1 (L1)</b>	9.0	-	-	-	
<b>República de los niños 2 (L2)</b>	9.0	-	-	-	

#### Conclusiones

El hecho de que se hayan encontrado amebas de vida libre en casi la totalidad de las muestras debe alertar sobre su amplia distribución en el ambiente, teniendo en cuenta que algunas corresponden a géneros (*Naegleria* y *Acanthamoeba*) que incluyen especies de probada acción patógena para el hombre. En la muestra A1 el desarrollo de AVL a 42 °C correspondió a ambos géneros, siendo importante destacar que no sólo *Naegleria* es termorresistente sino que algunas especies de *Acanthamoeba* también lo son.

Es notorio que en las muestras de alto pH no hubo desarrollo, posiblemente el mismo haya inhibido su presencia.

No hay que perder de vista que las muestras fueron tomadas de aguas con fines recreacionales, lo que hace aún más significativo su hallazgo. Existe riesgo sanitario pues algunas especies pueden ocasionar meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis granulomatosa y/o queratitis amebiana.

#### Bibliografía

- Peralta Rodríguez M, Ayala Oviedo J. Amebas de vida libre en seres humanos. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 2009; 25 (2): 280-92.
- Shibayama Salas M, Serrano Luna J, Tsutsumi V. Amibas de vida libre. En: Flisser A, Perez Tamayo R. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. 1er. México: ETM; 2006.pp 482-502.
- Oddó D. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. Rev Chil Infect 2006; 23 (3): 200-14.
- Pérez-Irezábal J, Martínez I, Isasa P, Jorge Barrón J. Queratitis por *Acanthamoeba*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24 (1): 46-52.
- Oddó D, Ciani S, Vial P. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*. Primer caso diagnosticado en Chile. Rev Chil Infec 2006; 23 (3): 232-6.
- Costamagna S. R. *Acanthamoeba* spp.: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre. Salud (i) Ciencia 2010; 17(8): 821-6.

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

- Sriram R, Shoff M, Booton G, Fuerst P, Visvesvara G. Survival of *Acanthamoeba* Cysts after Desiccation for More than 20 Years. J Clin Microbiol 2008; 46 (12): 4045-8.
- Muñoz V, Reyes H, Toche P, Cárcamo C, Gottlieb B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas publicas de Santiago de Chile. Parasitol Latinoam 2003; 58: 106-11
- da Rocha-Azevedo B, Tanowitz Herbert B, Marciano-Cabral F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free- Living Amoebae. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2009. Article ID 251406. disponible en: URL: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/251406.html>
- Gertiser M, Gigante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Luján H, et al. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Argen Microbiol 2010; 42: 122-5.
- Navarro Guerrero J, Zarco Villarosa D, Lourdoy Osés L, Alemán Rodríguez A. Queratitis por *Acanthamoeba*: a propósito de un caso bilateral. Farm Hosp 1998; 22 (5): 253-5.
- Ash-Orihel. Atlas de Parasitología Humana. 5ta. ed México. Ed. Panamericana; 2010. p 462