



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA
Y FARMACIA



“Caracterización morfológica, molecular y sensibilidad a dos desinfectantes de uso habitual en cepas de *Acanthamoeba* spp.”

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ALUMNA: Cecilia L. Diego

DIRECTORA: Dra. Viviana R. Randazzo

Bahía Blanca, octubre de 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA,
BIOQUÍMICA Y FARMACIA



**“Caracterización morfológica, molecular
y sensibilidad a dos desinfectantes de uso
habitual en cepas de *Acanthamoeba* spp.”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Firma de Alumna

Firma de Directora

Agradecimientos

A la Dra. Viviana Randazzo, por su confianza, acompañamiento, paciencia y apoyo durante todo el proceso para el desarrollo de la Tesis.

A la cátedra de Microbiología y Parasitología y Laboratorio de Parasitología Clínica, aportando el lugar de trabajo.

A mis padres, Rubén y Sulma, por alentarme a ser perseverante y que con esfuerzo se puede cumplir con cada objetivo, y por su apoyo incondicional.

A mi esposo, Marcos, por su paciencia, el aliento y el apoyo incondicional.

A amigos/as por su aliento.

Al jurado, por dedicar su tiempo para evaluar este trabajo.

INDICE

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Materiales y métodos	10
Resultados	18
Discusión	23
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos ameboides, anfizoicos, y de amplia distribución en la naturaleza. Existen cuatro géneros pertenecientes a este grupo que han demostrado ser patógenos potenciales para el ser humano y asociados a econosis: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*. Causan patologías graves y de alta morbimortalidad.

Acanthamoeba spp pertenece a los protozoos ambientales más prevalentes con distribución cosmopolita. Es patógeno oportunista y se asocia con queratitis, encefalitis amebiana e infecciones diseminadas. Puede actuar de reservorio de microorganismos de importancia sanitaria, estableciendo con ellos relaciones endosimbióticas. Su presencia en ambientes de interacción con los seres humanos constituye un potencial riesgo para la salud pública.

El objetivo de esta tesina fue identificar y caracterizar cepas de Amebas de vida libre aisladas de humedales continentales y de salas cerradas de un Hospital, evaluando comportamiento y sensibilidad frente a soluciones concentradas de dos desinfectantes de uso sanitario. Para ello se realizaron identificaciones mediante caracteres morfológicos, morfométricos y moleculares de dos cepas de *Acanthamoeba* spp, una cepa ambiental y la otra aislada de un hospital, determinándose posteriormente cualitativa y cuantitativamente la actividad biocida del hipoclorito de sodio (compuesto halogenado) y del cloruro dodecildimetilamonio (detergente catiónico) frente a cada una de ellas.

La exposición de los quistes y trofozoitos de *Acanthamoeba* spp. a soluciones concentradas de los dos compuestos químicos antes mencionados, produjeron cambios morfológicos en los biotipos del protozoario que llevaron a su destrucción.

El presente trabajo de Tesina contribuye con información relevante y novedosa acerca de la presencia de *Acanthamoeba* spp. en ámbitos no convencionales y aporta datos acerca del comportamiento de las cepas frente a compuestos químicos usados comúnmente para el aseo y desinfección de establecimientos sanitarios.

INTRODUCCIÓN

Las Amebas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos ameboides, anfitriónicos, y de amplia distribución en la naturaleza. Su ciclo de vida comprende dos biotipos diferentes: los **trofozoítos**, formas tróficas y reproductivas, metabólicamente activos, que se alimentan, se mueven y multiplican; y los **quistes** o estadios de resistencia, capaces de permanecer viables durante años (Gertiser, 2015). El enquistamiento responde a situaciones adversas del ambiente (presión osmótica, temperatura y escasez de alimento) y se revierte a la forma vegetativa o trofozoíto cuando las condiciones vuelven a ser favorables (Khan, 2006). Existen cuatro géneros de AVL potencialmente patogénicos para el ser humano y asociados a econosis: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, y *Sappinia* (Visvesvara et al, 1993; Tomassini et al, 2022). Si bien las patologías que producen son poco frecuentes, resultan graves y con elevada morbimortalidad (Marciano-Cabral, 2003). Entre los cuadros clínicos más frecuentes se citan enfermedades que afectan preferentemente al sistema nervioso central, reportándose, además, infecciones cutáneas en individuos inmunosuprimidos e infecciones corneales en sujetos inmunocompetentes (Kilvington et al, 1991; Khan, 2006; Reddy et al, 2010; Campana et al, 2017; Boletín integrado, 2019).

La clasificación taxonómica de las AVL (Tabla 1) ha variado con el tiempo, debido a los estudios de biología molecular y en especial, a la secuencia genómica de géneros y especies que se fueron aislando; sin embargo, se presentan ambigüedades en la clasificación, porque estos protozoos constituyen un grupo polifilético (Flisser et al, 2006).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de amebas de vida libre patógenas.

Dominio	Eukarya	Eukarya	Eukarya	Eukarya
Phylum	Percolozoa	Rhizopoda	Rhizopoda	Rhizopoda
Clase	Heterolobosea	Lobosea	Heterolobosea	Lobosea
Orden	Schyzopyrenida	Hartmannellida	Leptomyxa	Euamoebida
Familia	Vahlkampfiidae	Acanthamoebidae	Leptomyxidae	Thecamoebidae
Género	Naegleria	Acanthamoeba	Balamuthia	Sappinia

Según la Tabla 1, el Phylum Percolozoa agrupa organismos primitivos, algunos de los cuales pueden ser ameboflagelados con un flagelo transitorio, mientras que el Phylum Rhizopoda agrupa

organismos con seudópodos como medio de locomoción y alimentación (Flisser et al., 2006).

Los cuatro géneros de AVL que demostraron patogenicidad en humanos se clasificaron en 2 “Super Grupos”: **Amoebozoa** para *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*; y **Excavata** para *Naegleria* (Adl et al, 2012; Costamagna, 2018) (Tabla 2).

Tabla 2: Ubicación taxonómica actual, según Adl et al, 2012.

Super grupo Amoebozoa	Myxogastria	centramoebia	<i>Acanthamoeba</i> <i>Balamuthia</i>
		Thecamoebida	<i>Sappinia</i>
Super grupo Excavata	Discoba		<i>Naegleria</i>

Acanthamoeba spp se encuentra entre los protozoos ambientales más prevalentes con distribución cosmopolita. Es agente etiológico de queratitis y encefalitis amebiana así como de infecciones diseminadas (Abedkhozasteh et al, 2013; Aitken et al, 1996). La mayor parte de los casos humanos reportados tienen en común el uso de agua con escasa calidad sanitaria (Khan, 2006; Gertiser, 2015). Desde mitad del siglo XX se la ha vinculado con la transmisión ambiental de diferentes microorganismos (Krishna-Prasad et al, 1978). Investigaciones recientes confirman su capacidad para actuar como reservorio de microorganismos productores de diversas patologías de interés en salud pública (Mella et al, 2016; Benito et al, 2018). *Acanthamoeba* spp fagocita organismos presentes en el ambiente y en determinadas condiciones (Drozanski et al 1961; Avery et al, 1995), algunos de ellos, logran multiplicarse en el interior de la ameba, escapando de la lisis celular. Los microorganismos que logran sobrevivir a la fagocitosis, se denominan microorganismos resistentes a amebas (ARM) y entre ellos se han descrito bacterias, hongos, protozoos y virus potencialmente patógenos para el ser humano (La Scola et al 2001; Greub et al, 2004; Lorenzo-Morales et al, 2007; Iglesias-Osores, 2019; Bulle et al, 2020). La capacidad endosimbiótica de *Acanthamoeba* spp resulta de vital importancia para la perpetuación de la cadena epidemiológica de muchas enfermedades infecciosas con impacto en salud pública. La ameba se comporta como un verdadero “*Caballo de Troya*” permitiendo a los endosimbiontes permanecer, resistir y diseminarse en ambientes que no son los ideales para su crecimiento. En el interior de las AVL los microorganismos están protegidos de las inclemencias del ambiente, de las defensas del hospedador y de la acción de los agentes quimioterapéuticos utilizados para su control. Además, los endosimbiontes pueden reproducirse, aumentando así su número para

producir enfermedades (Proca-Ciobanu, 1975; Amann et al, 1997; Mella et al, 2016; Iglesias-Osores, 2019).

Si bien existen en la literatura reportes de casos acerca del aislamiento de *Acanthamoeba* spp en el ambiente hospitalario (De Souza et al, 2017; Bulle et al, 2020), en Argentina existe escasa información. En ese sentido, en un primer estudio realizado por Tomassini et al 2022, se aislaron AVL en lavamanos y equipamientos con reservorios de agua (incubadoras con microclima y humidificadores respiratorios) de salas cerradas de un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires. En el 87% de los equipamientos con reservorio de agua y en el 100% de los lavamanos se obtuvieron aislamientos de AVL, morfológicamente compatibles con *Acanthamoeba* spp confirmándose posteriormente mediante identificación molecular. Por la naturaleza oportunista de *Acanthamoeba* spp por su capacidad patogénica per se y su participación como reservorio en la cadena de transmisión de diferentes microorganismos causantes de enfermedad en los seres humanos, la presencia de la misma en ambientes hospitalarios representa una señal de alarma que debe ser notificada, monitoreada y controlada (Castrillón et al, 2013).

Desde el descubrimiento de *Acanthamoeba* como agente causal de enfermedad se ha testado la actividad amebicida de varios compuestos, con el fin de aplicarlos al tratamiento de las infecciones causadas por amebas o bien para utilizarlos como desinfectantes ambientales, tanto sobre trofozoítos como sobre quistes (Castrillón et al, 2013). El hallazgo de cepas de amebas en el ámbito hospitalario abre un nuevo paradigma y enfatiza la necesidad urgente de los diferentes Comités de Infecciones Hospitalarias para investigar la presencia de estos protistas en el ámbito sanitario, implementando medidas de higiene y desinfección eficientes. Para ello es fundamental dirigir los esfuerzos a fin de encontrar agentes biocidas útiles y efectivos frente a estos verdaderos "*Caballos de Troya*" biológicos (Carlesso et al, 2010; Bulle et al, 2020).

Varios agentes quimioterapéuticos, extractos naturales y compuestos químicos se han testado *in vitro* para determinar su efecto sobre especies de *Acanthamoeba*. Entre ellos se citan agentes químicos como las biguanidas, detergentes catiónicos y anti fúngicos (Burger y col., 1994; Khan, 2009) y de desinfectantes ambientales tales como cloro y sustancias halógenas (De Jonckheere et al, 1976; Mogoia et al, 2010; Gertiser, 2015). Los resultados han sido variables, y algunos cuestionables, ya que las diferentes cepas presentan comportamientos versátiles dependiendo de las condiciones de cultivo, de su virulencia o de su capacidad de crecimiento. En muchos casos el inconveniente de estas experiencias fue la falta de correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y los esperados *in vivo*. En este sentido, el presente trabajo de Tesina contribuirá al conocimiento del tema, poniendo a prueba el efecto de compuestos químicos usados habitualmente para la limpieza y desinfección de establecimientos sanitarios, sobre quistes y trofozoitos de *Acanthamoeba* spp.

En el presente estudio se procuró como **Objetivo General** caracterizar dos cepas de *Acanthamoeba* spp una cepa ambiental y la otra aislada de salas cerradas de un hospital, evaluando la sensibilidad de las mismas frente a soluciones concentradas de dos desinfectantes de uso sanitario.

Los **objetivos específicos** fueron:

✓ Identificar mediante caracteres morfológicos, morfo métricos y moleculares diferentes tipos de AVL potencialmente patógenas para el ser humano.

✓ Determinar cuali y cuantitativamente, la actividad biocida del hipoclorito de sodio (compuesto halogenado) y del cloruro dodecildimetilamonio(detergente catiónico) sobre quistes de *Acanthamoeba* spp ambiental y hospitalaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante todo el procesamiento de las distintas muestras se garantizaron las condiciones de esterilidad, tanto en el uso de instrumental como en el de recipientes debidamente esterilizados y conservados. Al tratarse de cepas ubicuistas se procuró evitar la contaminación ambiental durante todas las etapas del proceso.

➤ 1) Aislamiento e Identificación parasitaria

a. Cepas de *Acanthamoeba*

Se trabajó con el cultivo de dos cepas de *Acanthamoeba* spp previamente tipificadas y conservadas: una cepa ambiental aislada de un humedal continental del sudoeste Bonaerense y conservado en el laboratorio de Parasitología Clínica del Dpto. de BByF de la UNS, y una cepa aislada de un lavamanos de una sala cerrada de Neonatología de un Hospital pediátrico de la ciudad de Mar del Plata, Argentina.

b. Cultivo

Con el fin de identificar y caracterizar morfológicamente y morfométricamente las cepas se realizaron cultivos de las mismas en placas de Petri con agar no nutritivo (Britania) suplementado con *Escherichia coli* ATCC 25922 en solución de Page (Page, 1988) (Figs. 1 y 2) e incubadas en estufas de cultivo a 37 °C. Las placas fueron monitoreadas durante 7 días. Para determinar la existencia de crecimiento parasitario, se realizaron observaciones con un microscopio óptico (entre cubre y portaobjetos) en 100 y 400 aumentos cada 24 horas (Fig. 3). El cultivo fue considerado positivo cuando se observaron trofozoítos y/o quistes de *Acanthamoeba* spp (Fig. 4 y 5)

En los cultivos positivos se estudiaron las características morfológicas y morfométricas de trofozoítos y quistes. En el caso de trofozoítos se evaluaron tamaño, presencia de acantópodos,seudópodos, características del núcleo y presencia o no de vacuola pulsátil. En el caso de quistes se evaluaron forma y tamaño (Molet y Kremer, 1976; Page, 1988). Para esto, se colocaron 500 µL de solución de Page, se dejó 30 segundos en contacto y se tomó un volumen equivalente para realizar la observación microscópica de las estructuras.

Las observaciones microscópicas se realizaron mediante un microscopio Leica DM500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) con *software* Leica LAS EZ (v3.2.1) y las imágenes se registraron mediante una cámara Leica ICC50 HD (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

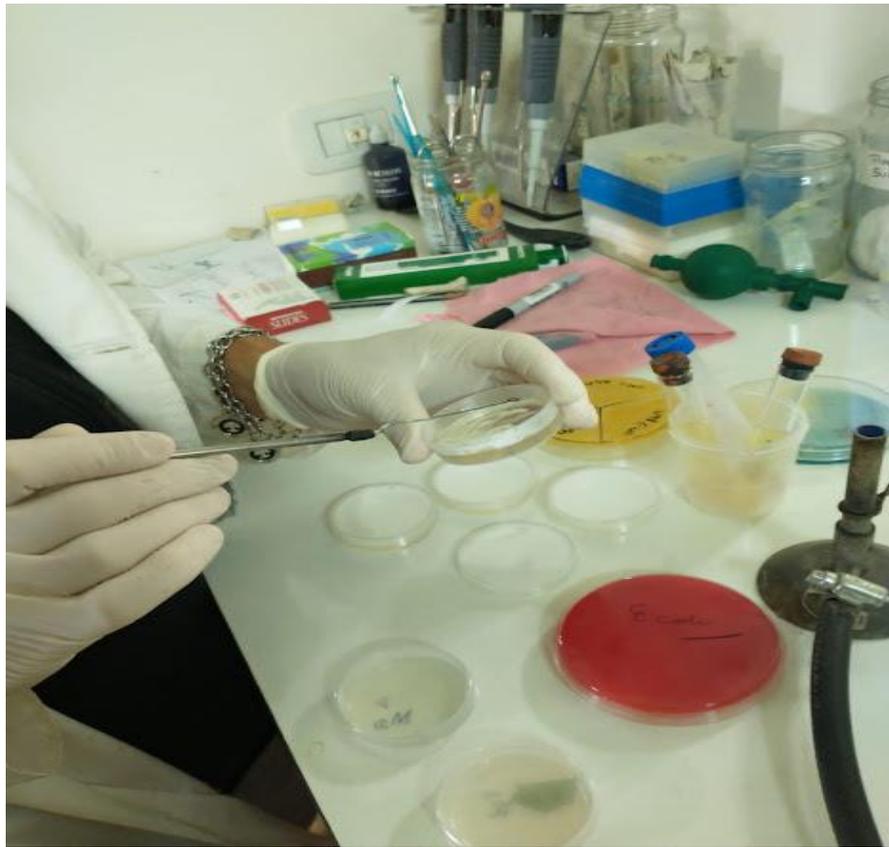


Figura 1: Cultivo de las muestras en Agar No Nutritivo.



Figura 2: Preparación de la suspensión de *Escherichia coli* en solución de Page



Figura 3: Observación al MO Leica DM500.



Figura 4: Observación microscópica de quistes de *Acanthamoeba* spp (400 X).



Figura 5: Observación microscópica de *Acanthamoeba* spp (400 X).

c. Extracción de ADN e identificación molecular de *Acanthamoeba* spp a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se extrajo ADN genómico de las muestras utilizando el kit de extracción Quick- gDNATM Mini-Prep de ZYMO Research- Epigenetics Company (Fig 6). Las muestras fueron sometidas a una PCR con cebadores específicos (Invitrogen - Massachusetts, EE.UU.) para amplificar un fragmento del gen *18S rDNA* (Gast et al, 1996). Para el género *Acanthamoeba* se utilizó el par de específicos JDP1 (5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3') y JDP2 (5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3').

Se realizó la mezcla de reacción con 2,5 μ L *buffer* (Promega), 0,5 μ L de una mezcla de DNTP (10 mM de cada uno, Promega), 1,5 μ L (20 μ M) de cada cebador, 32 1,25 Utaq (Promega) y 5,0 μ L de ADN. Se llevó a 25 μ L de volumen final con agua libre de nucleasas (Biodynamics). Se utilizó un termociclador IVEMA T18 para la amplificación (Fig. 7). Las condiciones de reacción fueron: 95 °C durante 7 min, 45 ciclos (95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min), y una extensión final de 72 °C durante 10 min, siguiendo protocolos publicados por Schroeder *et al.* y Regoudis *et al.* (Regoudis et al, 2015; De Souza et al, 2017; 74).

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis, utilizando cuba ENDURO LabNet (LabNet International Inc., EE.UU.), en gel de agarosa (Biodynamics) al 1,5%

durante 30 min y a 80 mA con tinción de bromuro de etidio durante 15 min. Por cada calle se cargaron 10 μ L del producto de la amplificación. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con una escalera de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos, Argentina). El resultado de la electroforesis fue visualizado bajo luz UV con un transiluminador Maestro-Gen (Fig. 8).



Figura 6: Extracción de ADN de las muestras

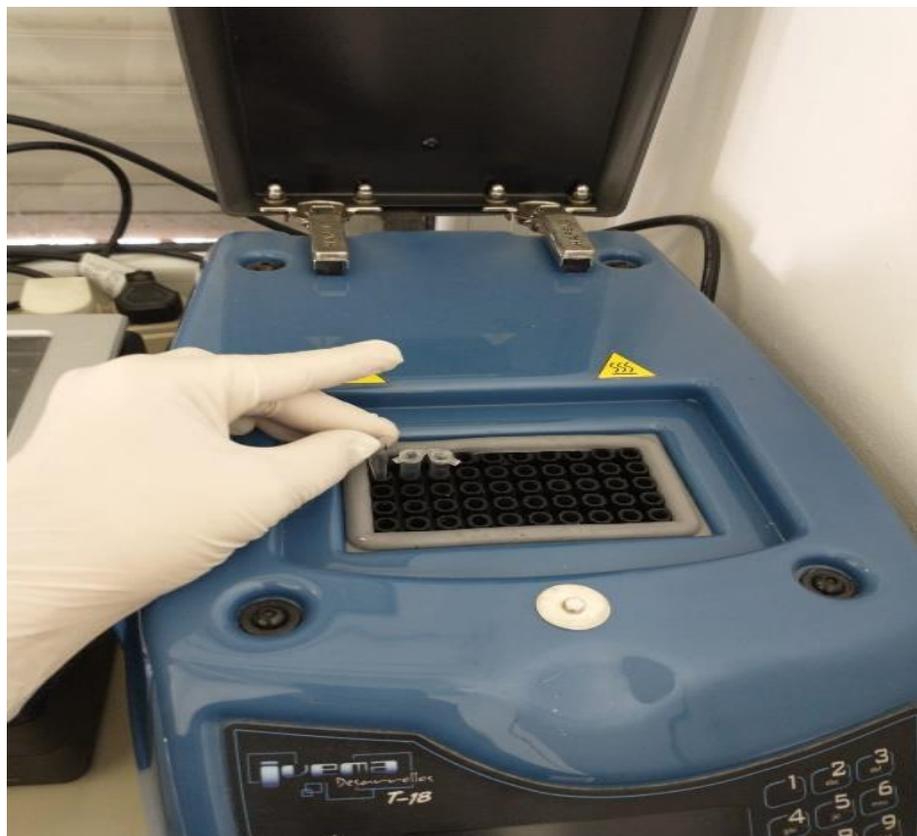


Figura 7: Colocación de las muestras en Termociclador IVEMA T18



Figura 8: Transiluminador Maestro-Gen utilizado para visualizar el resultado de electroforesis.

➤ **2) Determinación de la actividad biocida del hipoclorito de sodio (compuesto halogenado) y del cloruro dodecildimetilamonio (detergente catiónico) sobre quistes de *Acanthamoeba* spp**

a. Cepas de *Acanthamoeba* spp

Para las experiencias se utilizaron las cepas de *Acanthamoeba* spp citadas en el punto 1 de Materiales y Métodos: la cepa ambiental y la hospitalaria. En cada caso y para garantizar la obtención de quistes maduros las muestras con los aislamientos de las respectivas cepas se sembraron en medio MYAS (Malt extract-Yeast extract-Amoebae Saline: extracto de maltosa 0,01%, extracto de levadura 0,01% en solución de Page) con un inóculo de *Escherichia coli*, y se mantuvieron por un período de un mes.

b. Detección de la acción biocida de las soluciones de Cloro

Se prepararon soluciones de cloro comercial, agua-lavandina (55g/l), en concentraciones crecientes, 24; 36; 48 y 60 partes por millón (ppm), en agua desionizada estéril. Para ello se usaron

botellas de vidrio estériles con las distintas soluciones de cloro, a las que se les inocularon 1 ml de una suspensión de $1,3 \times 10^5$ quistes / ml en un volumen final de 125 ml. Para ambas cepas de *Acanthamoeba* los quistes fueron contados en cámara de Neubauer (Fig. 9).

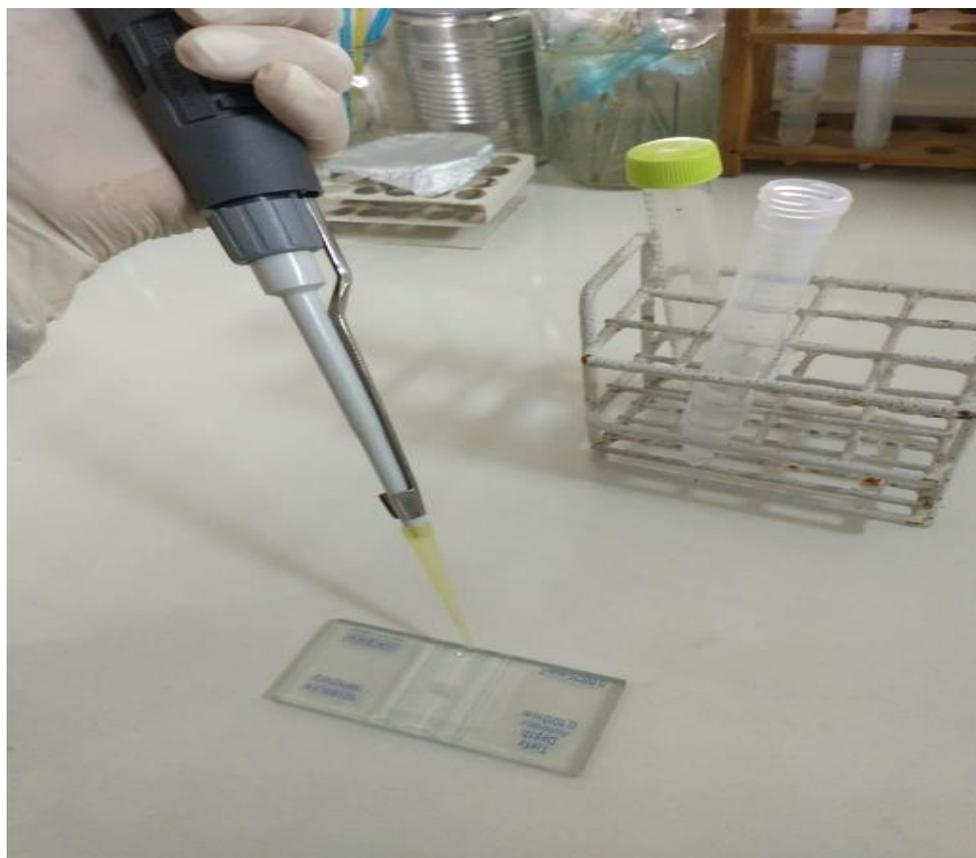


Figura 9: Colocación de suspensión de quistes de *Acanthamoeba* en cámara de Neubauer.

Para cada concentración, y a distintos intervalos de tiempo, 30 y 60 min; 3; 6 y 24 h, se tomaron alícuotas de aproximadamente 11 ml en un tubo estéril con un cristal de tiosulfato para detener la acción del cloro, previa homogeneización. Se contrastó con control sin cloro.

Estos tubos se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante reteniendo 1 ml aproximadamente, en el que se re suspendió el pellet que se utilizó para la siembra.

Siembra: Se realizó en ANN y tal lo indicado en el punto 1 de M y M (Ver Cultivo)

Las concentraciones de cloro que inhibieron el desarrollo de las cepas en ANN se consideraron con actividad quisticida positiva. Se observaron al microscopio óptico los quistes expuestos a las distintas concentraciones de cloro para evidenciar posibles alteraciones morfológicas. Se documentó con microfotografías en microscopio óptico.

c. Detección de la acción biocida del cloruro dodecildimetilamonio (detergente catiónico)

Se prepararon soluciones de cloruro dodecildimetilamonio de uso hospitalario en agua desionizada estéril al 1,6%. Para ello se usaron botellas de vidrio estériles a las que se les inocularon 1 ml de una suspensión de $1,3 \times 10^5$ quistes / ml en un volumen final de 100 ml.

Para ambas cepas de *Acanthamoeba* los quistes fueron contados en cámara de Neubauer. A distintos intervalos de tiempo, 30 min; 1h, 2h, 3h, 4h y 24 h, se tomaron alícuotas de aproximadamente 11 ml en un tubo estéril previa homogeneización. Se contrastó con control sin detergente.

Los tubos se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante reteniendo 1 ml aproximadamente, en el que se re suspendió el pellet que se utilizó para la siembra.

Siembra: Se realizó en ANN y tal lo indicado en el punto 1 de M y M (Ver Cultivo)

Se observaron al microscopio óptico los quistes expuestos al cloruro dodecildimetilamonio al 1,6% para evidenciar posibles alteraciones morfológicas.

Se determinó el tiempo en el que el detergente catiónico inhibió el desarrollo de las cepas en ANN considerándose dicho tiempo de exposición como el necesario para obtener actividad quisticida positiva.

Se documentó con microfotografías en microscopio óptico.

RESULTADOS

1. Cepas de *Acanthamoeba*

Ambas cepas cultivadas, ambiental y la hospitalaria se correspondieron morfológicamente con el género *Acanthamoeba*. Los trofozoítos fueron de un tamaño variable entre 13,5 μm y 25,5 μm , mientras que los quistes presentaron un tamaño entre 6,3 μm y 13,4 μm .

Los cultivos incubados a 42°C no mostraron desarrollo. Tanto la cepa hospitalaria como la ambiental fueron clasificadas morfológicamente como pertenecientes al género *Acanthamoeba*, Grupo II (Pussard y Pons, 1977)

a. Ceba ambiental: En la observación microscópica, de la cepa ambiental, los trofozoítos mostraron movimientos ameboides por emisión de pseudópodos y finas proyecciones citoplásmicas, los característicos acantópodos; núcleo refringente y vacuolas de exclusión de agua muy visibles que se contraían y desaparecían intermitentemente (Fig. 10). Los quistes presentaron una doble pared, compuesta por una externa, irregular o lisa y gruesa (exoquiste), y otra interna (endoquiste) más fina y lisa, poliédrica o esférica, criterio utilizado para la clasificación del género *Acanthamoeba* en Grupos de Pussard & Pons, 1977 (Fig. 11).

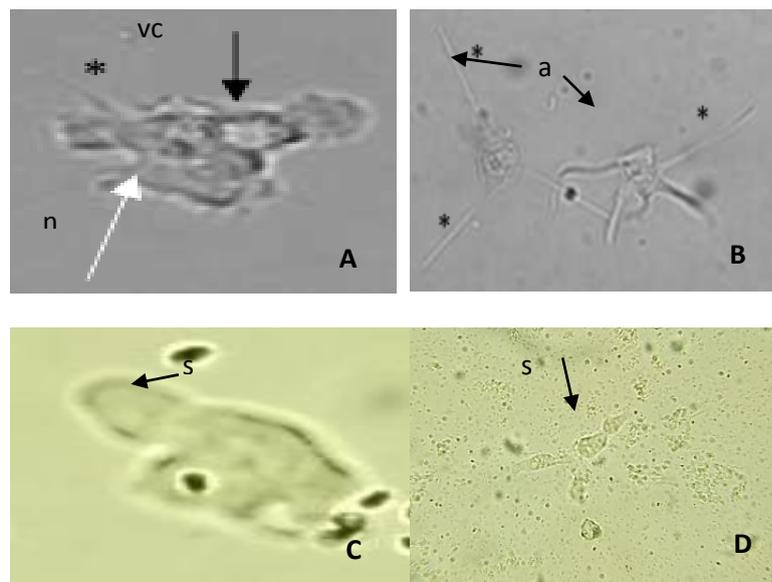


Figura 10: A) Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp con vacuola contráctil (vc) y núcleo (n)(1000X).

B) Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp con acantópodos (a)(1000X). C) y D) Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp con pseudópodos (s) (C: 1000X) (D:400X).



Figura 11: Observación de quistes con su doble pared característica(400X).

b. Cepa hospitalaria: En la observación microscópica, de la cepa hospitalaria, los trofozoítos mostraron movimientos muy lentos, en comparación con la cepa ambiental y emisión deseudópodos y acantopodos (Fig. 12). Los quistes, presentaron doble pared, la externa, irregular y gruesa y la pared interna fina y lisa, característica del género *Acanthamoeba* (Fig. 13).

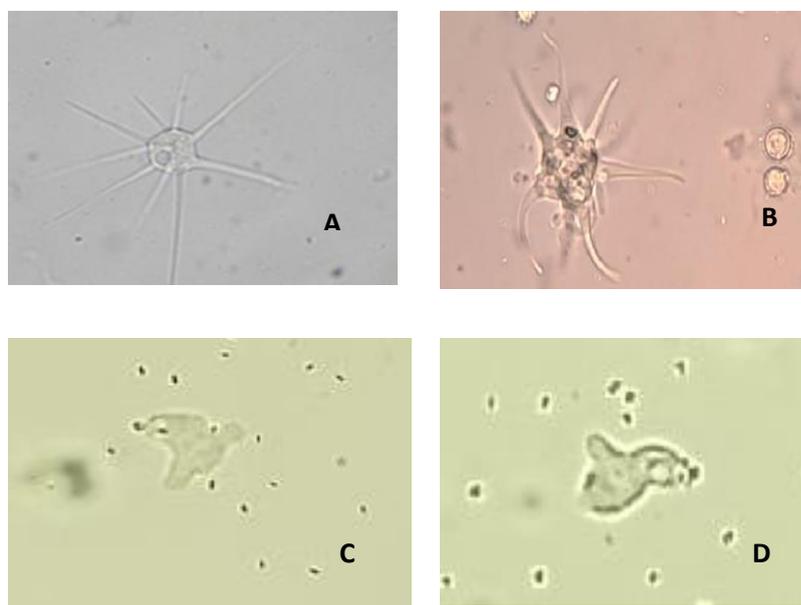


Figura 12: A) y B) Trofozoitos de *Acanthamoeba* spp con acantópodos. C) y D) Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp con pseudópodos(1000 X)

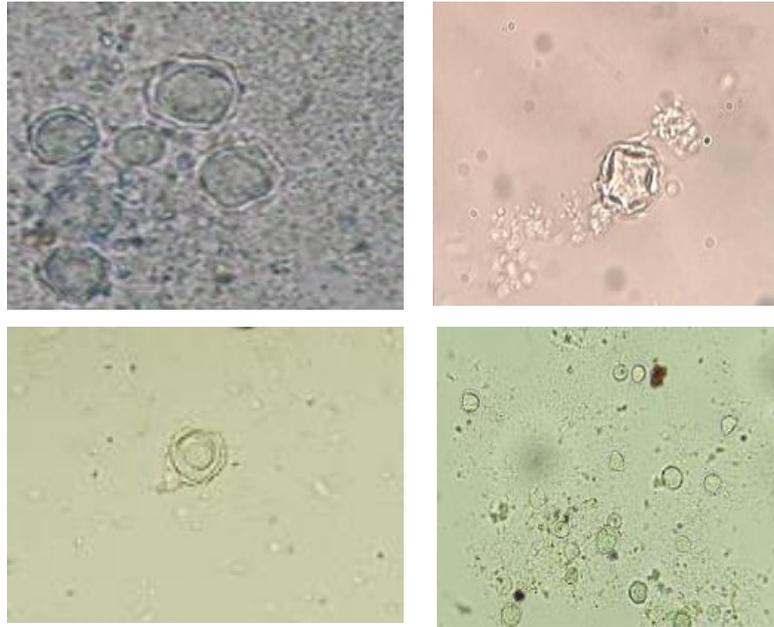


Figura 13: Observación de quistes de *Acanthamoeba* spp con su característica doble pared, exoquiste irregular y endoquiste lisa(400 X)

Los resultados de la Reacción de la Polimerasa en cadena (PCR) confirmaron molecularmente ambas cepas como *Acanthamoeba* spp. La ubicación genérica se determinó según los protocolos publicados por Schroeder et al, 2001 y Booton et al, 2002 (Fig. 14).

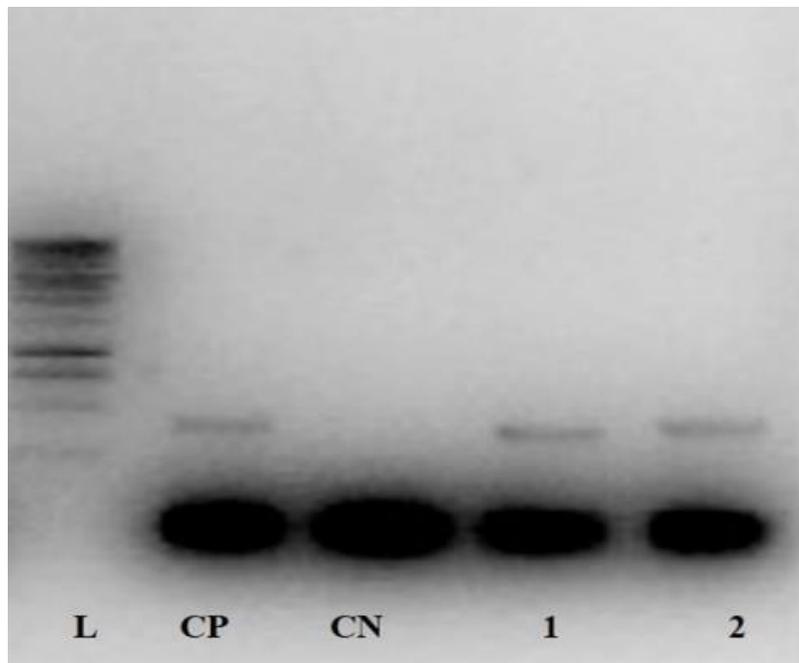


Figura 14: PCR correspondiente a muestras: L: Ladder; CP: control positivo; CN: control negativo; 1. Muestra Ambiental y 2: Muestra Hospitalaria.

2. Acción biocida de las soluciones de Cloro

En la cepa ambiental (A), aislada de humedales, las concentraciones de 24, 36 y 48 ppm no lograron inhibir el crecimiento dentro de las 24 horas de observación, mientras que con 60 ppm la actividad quisticida se evidenció a partir de las 3 horas de exposición.

Para la cepa aislada del hospital (H), con 24 y 36 ppm se observó desarrollo hasta las 5 horas de exposición, mientras que con 48 hasta las 2 horas y con 60 ppm la actividad quisticida se evidenció con 1 hora de exposición.

En la Figura 15 se resume el desarrollo de las distintas cepas de acuerdo a las distintas concentraciones de cloro a las que fueron expuestas.

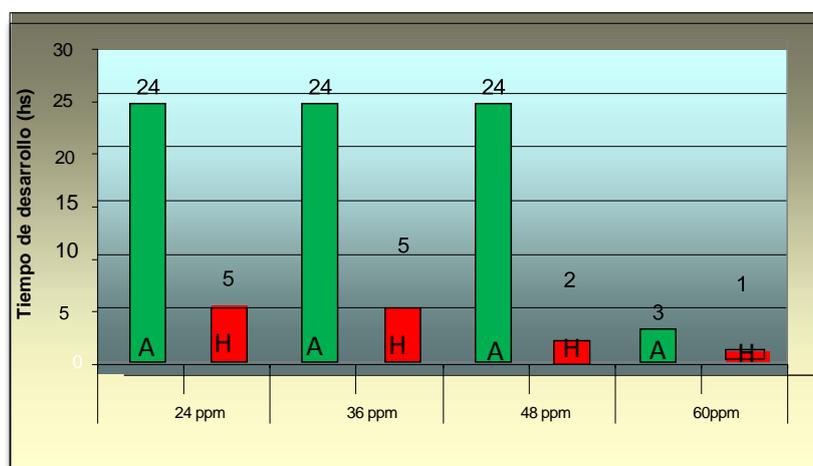


Figura 15: Desarrollo de los cultivos en relación con las concentraciones de cloro y el tiempo de exposición (A (verde): Cepa ambiental; H (rojo): Cepa hospitalaria).

3. Acción biocida de la solución de cloruro dodecildimetilamonio al 1,6%

Transcurridas 30 min; 1h; 2h ,3h, 4h y 24 h de incubación se realizaron observaciones microscópicas entre porta y cubreobjetos, considerándose efecto quisticida positivo al tiempo necesario en el que el cloruro dodecildimetilamonio al 1,6%(detergente catiónico) inhibiera el desarrollo .

La Tabla 3 resume el crecimiento de las cepas de acuerdo al tiempo de exposición frente a la solución.

En la cepa ambiental (A), aislada de humedales, la actividad quisticida se evidenció a partir de 3 horas de exposición.

Para la cepa aislada del hospital (H), la actividad quisticida se evidenció a partir de 1 hora de exposición.

Tabla 3: Resultado de cultivos de cepa ambiental y hospitalaria de *Acanthamoeba* spp según el tiempo de exposición a la solución de cloruro dodecilmetilamonio al 1,6%.

	Crecimiento en tiempos de exposición					24 h
	30 min	1h	2h	3h	4h	
Control (Page)	+	+	+	+	+	+
Cepa Ambiental	+	+	+	+	-	-
Cepa Hospitalaria	+	+	-	-	-	-

DISCUSION

Las cepas de AVL (ambiental y hospitalaria) empleadas en esta tesina fueron identificadas morfológica, morfométrica y molecularmente como *Acanthamoeba* spp, un protozoo que presenta una forma quística altamente resistente a la desecación y a las condiciones climáticas extremas y un trofozoito amebode o forma vegetativa infectante (Castrillón et al, 2013).

Ambas cepas de *Acanthamoeba* spp aisladas correspondieron al Grupo II (Pussard et al, 1977). Este grupo se ha descrito con mayor frecuencia en aislamientos ambientales y en muestras clínicas (Stothard et al, 1998) y dentro del mismo es posible ubicar especies pertenecientes al genotipo T4 (Walochnik et al., 2000) que incluye los agentes más comunes responsables de queratitis y encefalitis granulomatosa amebiana e infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos (Khan, 2006; Oddo, 2006; Siddiqui et al, 2012).

El aislamiento de *Acanthamoeba* spp en salas cerradas de un hospital evidencia la preocupante ubicuidad, versatilidad y adaptación de AVL al ambiente hospitalario (Costamagna et al, 2010; Mella et al, 2016; Bullé et al, 2020). Si bien las AVL se encuentran entre los protozoos ambientales más prevalentes y poseen una distribución cosmopolita, la preocupación para la salud pública reside no solo por el poder patógeno de *Acanthamoeba* spp., frente a pacientes de alto riesgo, sino además por la capacidad del protista de actuar como reservorio de microorganismos de circulación intrahospitalaria (Bullé et al, 2020). Las bacterias, hongos y virus de circulación intrahospitalaria, incluyen una diversidad de microorganismos potencialmente patógenos que conducen a enfermedades infecciosas dentro del ambiente hospitalario, razón por la cual resulta fundamental realizar la vigilancia epidemiológica. En este sentido, diversos autores señalan la preocupante relación entre *Acanthamoeba* spp., y bacterias asociadas a infecciones intranosocomiales (Huws et al, 2006; Carlesso et al, 2010). La presencia de *Acanthamoeba* spp en el ambiente hospitalario, y su capacidad de actuar como “*Caballo de Troya*” de bacterias multiresistentes y formadoras de biofilm, amplificaría la diseminación y la selección de mecanismos de resistencia de las mismas, generando infecciones intrahospitalarias de mayor severidad; (De Souza et al, 2017; Iglesias-Osores, 2019; Bullé et al, 2020). Al respecto, De Souza (De Souza et al, 2017) y Huws (Huws et al, 2006) demostraron mediante cocultivos la interacción endosimbiótica entre cepas de *Acanthamoeba* spp y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La endosimbiosis favoreció el enquistamiento del protozoo y el aumento de la virulencia y de la capacidad de diseminación de MRSA (De Souza et al, 2017). Así mismo, otras investigaciones señalan, que la relación endosimbiótica de *Acanthamoeba* spp con hongos del género *Fusarium* incrementaría la severidad de diversas patologías, entre ellas, la queratitis infecciosa (Bullé et al, 2020).

Por la naturaleza oportunista de *Acanthamoeba* y su papel como reservorio de patógenos humanos, resulta fundamental que los diferentes Comités de Infecciones hospitalarias dirijan sus

esfuerzos para monitorear la presencia de estos protistas en hospitales y centros de salud, implementando medidas de higiene y desinfección eficientes

Con referencia a la acción quística del cloro, la especie de *Acanthamoeba* aislada en el hospital mostró mayor sensibilidad a la acción del cloro, que la especie ambiental. No obstante, para obtener efecto quístico, fueron necesarias altas concentraciones de cloro sostenidas en el tiempo, por lo cual, el tratamiento con soluciones cloradas concentradas, en forma directa, posee baja efectividad para la prevención y el control de *Acanthamoeba* spp en salas cerradas de establecimientos sanitarios.

En lo que respecta a la cepa ambiental, y considerando al agua como una de las principales fuentes de diseminación de *Acanthamoeba* spp (Schiemann, 2013), la alta resistencia del protista frente a soluciones cloradas concentradas sumado a la ubicuidad del mismo, impiden su eliminación de humedales continentales recreacionales por lo que, como medida preventiva y de control, resulta imprescindible informar a las autoridades sanitarias así como a las personas en riesgo de los peligros que representa la exposición a aguas potencialmente contaminadas.

A diferencia de las soluciones cloradas, el detergente catiónico cloruro dodecildimetilamonio al 1,6% resultó efectivo tanto con la cepa ambiental como la hospitalaria de *Acanthamoeba* spp. La solución de trabajo del detergente al 1,6% es usada habitualmente en instituciones sanitarias para la desinfección de instrumental, aparatología, mesadas y camillas, etc. en tiempos variables de aplicación.

Respecto a la cepa hospitalaria, los resultados mostraron que el efecto quístico se logró transcurrida la hora de exposición al desinfectante, eliminando el 100% de los microorganismos. La cepa ambiental, resultó más resistente, necesitando para su eliminación 2h de exposición.

El aislamiento de *Acanthamoeba* spp dentro del ambiente hospitalario, interpelaría el concepto de efectividad de las medidas de desinfección utilizadas dentro de los establecimientos de salud. En ese sentido los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan una herramienta fundamental para la vigilancia epidemiológica y el control sanitario y, contribuyen, significativamente para la implementación de estrategias de control en la institución.

CONCLUSIONES

- Se describen y validan morfológica, morfométrica y molecularmente dos cepas de *Acanthamoeba* spp., una de ellas aislada en un humedal continental, usado con fines recreativos, y la otra aislada recientemente en una sala cerrada de un Hospital pediátrico.
- Se valida el perfil quisticida de dos agentes desinfectantes determinándose el tiempo y la concentración necesaria de cada uno de ellos para eliminar quistes de *Acanthamoeba* spp.
- Este trabajo destaca la ubicuidad y adaptabilidad de *Acanthamoeba* spp en diversos ambientes, y proporciona información relevante que puede ser utilizada para la desinfección y eliminación de *Acanthamoeba* spp en las salas cerradas de instituciones sanitarias, con especial aplicación en el hospital en donde fue aislado el protista.

BIBLIOGRAFÍA

Abedkhokasteh H, Niyiyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M y col. First Report of Hartmannella keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. Iran J Parasitol. 2013; 8: 481-485.

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowse S, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, MacManus H, Mitchell EA, Mozley-Standrige SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnow A, Spiegel FW. 2012. The revised Classification of Eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology 60: 429-507.

Aitken, D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed Vahlkampfia and Hartmannella infection. Ophthalmology. 1996; 103, 485-494.

Amann R, Springer N, Schönhuber W, Ludwig W, Schmid E, Müller K. Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoeba* related to Chlamydiaspp. Appl Environ Microbiol. 1997; 63:115-121.

Avery SV, Harwood JL, Lloyd D. Quantification and characterization of phagocytosis in the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* by flow cytometry. Appl Environ Microbiol. 1995; 61:1124-1132.

Benito M, La Plante D, Fernández MT, Miguel N, Lasheras AM, Gómez J. Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas. Rev. salud ambient. 2018; 18(1):69-77.

Boletín Integrado de Vigilancia, 2022.
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_463_cuatrisesanal.pdf

Boon Gc, Kelly DJ, Chu YW, Seal D, Houg E, Lam D, Byer TJ, Fuerst PA. (2002). 18S rDNA Sequence Typing and Tracking of *Acanthamoeba* spp from Corneal Scrape, Contact Lenses, Lens Cases and Home Water Supplies of *Acanthamoeba* Keratitis Patients in Hong Kong. J. Clinical Microbiology 40: 1624-1625.

Bullé, DJ; Benitez, LB; Rott, MB. Ocorrência de *Acanthamoeba* em hospitais: uma revisão da literatura. Journal of Epidemiology and Infection Control 2020; 10 (2):174-80.

Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. Curr Microbiol 2010; 60 (3):185-90.

Castrillón JC y Orozco LP. *Acanthamoeba* spp como parásitos patógenos y oportunistas. Rev Chilena Infect 2013; 30: 147-155.

Costamagna SR, Gertiser ML, Visciarelli E, Basabe N, y Felice V. *Acanthamoeba* spp.: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre. “Salud (i) Ciencia”. 2010; 17(8):821-826. ISSN: 1667-8982.

Costamagna, SR (2018). Breve reseña sobre infecciones humanas por amebas de vida libre en Argentina. Revista Argentina de Parasitología, 7.

De Jonckheere J; Van de Voorde H. Differences in destruction of Cysts of Pathogenic and Nonpathogenic Naegleria and *Acanthamoeba* by Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 1976; 31: 294-297. 82.

De Souza TK, Soares SS, Benitez LB, Rott MB. Interaction Between Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. Curr Microbiol 2017; 74 (5): 541-49.

Drozanski W, Drozanska D. Dead bacteria as a food for Amoebae. Acta Microbiol Pol. 1961; 10:379–387.

Flisser A., Pérez R. Amibas de vida libre. En: aprendizaje de la parasitología basado en problemas. México DF: Editores de textos mexicanos; 2006. Pág. 490.

Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. J Eukaryot Microbiol. 1996; 43: 498-504.

Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Occhionero M, Visciarelli E, Costamagna SR. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular, en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbio. 2010; 42:122-125. ISSN: 0325-7541.

Gertiser ML. “Aspectos biológicos y epidemiológicos de Amebas de Vida Libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp.” 2015. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. 206 pág.

Iglesias-Osores, S. Infección amebiana con *Staphylococcus aureus* MRSA, alerta microbiana en los hospitales. Rev. cuerpo méd. HNAAA 2019; 12(2): 178-79.

Huws SA, Smith AW, Enright MC, Wood PJ, Brown MRW. Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA. *Environ Microbiol* 2006; 8 (6):1130- 133.

Khan, NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006; 30, 564-595.

Kilvington S, Beeching JR, White GD. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *Journal of Clinical Microbiology.* 1991; 29:310-314.

Krishna-Prasad BN, Gupta SK. Preliminary report on the engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas, 1930. *Curr Sci* 1978; 47, 245-247.

Krishna-Prasad, B.N. y Gupta, S.K. "Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas". *Curr Sci* 1978; 47: 245-47.

La Scola, B; Raoult, D. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7, 75-79.

Lorenzo-Morales J, Coronado-Alvarez N, Martinez-Carretero E, Maciver SK and Valladeres B. Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:753-756.

Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro ES. Freelifving amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap wáter supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *J Water Health.* 2010; 8:71-82.

Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. "*Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans". *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (2): 273-307.

Mella C, Medina G, Flores-Martin S, Toledo Z, Simaluiza RJ, Pérez-Pérez G y Fernández, H. Interaction between zoonotic bacteria and free living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance? *Arch Med Vet* 2016; 48, 1-10

Molet B, Kremer M. Techniques d'études et criteres morphologiques pour l' identification des amibes libres. Bull Soc Sci Vet Med Comp Lyon 1976; 78: 215-24.

Oddo B. Infecciones por amebas de vida libre: comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatomo-clínicos. Rev Chilena Infectol. 2006; 23, 200-214.

Page FC. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater, Biological Association. UK: Ambleside Cumbria, 1988; 122.

Proca-Ciobanu M. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. Int J Parasitol. 1975; 5:49–56.

Regoudis E & Pélandakis, M. Detection of the free living amoeba *Naegleria fowleri* by using conventional and real-time PCR based on a single copy DNA sequence. Experimental Parasitology 2015; 161:35-9.

Schiemann DA. *Yersinia enterocolitica* in drinking water. In: McFeters GA (ed). Drinking water microbiology: progress and recent developments. Springer Science & Business Media, New York, USA.2013; 322-339.

Tomassini , Lorian; Costamagna, Sixto Raúl; Randazzo, Viviana. Aislamiento de *Acanthamoeba* spp en salas cerradas de un hospital de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 2022; 56(4), 521-526.

Visvesvara GS, Schuster FL & Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris* agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J Eukaryot Microbiol 1993; 40: 504