

María Teresa Fernández Rodrigo

Caracterización molecular de  
Amebas de Vida Libre e  
identificación de otros parásitos en  
aguas de red de la provincia de  
Zaragoza: asociación con otros  
microorganismos y riesgos para la  
Salud Pública

Departamento  
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud  
Pública

Director/es  
Goñi Cepero, María Pilar  
Clavel Parrilla, Antonio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AMEBAS DE  
VIDA LIBRE E IDENTIFICACIÓN DE OTROS  
PARÁSITOS EN AGUAS DE RED DE LA  
PROVINCIA DE ZARAGOZA: ASOCIACIÓN CON  
OTROS MICROORGANISMOS Y RIESGOS PARA  
LA SALUD PÚBLICA

Autor

María Teresa Fernández Rodrigo

Director/es

Goñi Cepero, María Pilar  
Clavel Parrilla, Antonio

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

2014





1542

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

“Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza. Asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública“

***M<sup>a</sup> Teresa Fernández Rodrigo***



Zaragoza, 2014

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**Facultad de Medicina Departamento de  
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública**

“Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e  
identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia  
de Zaragoza. Asociación con otros microorganismos y riesgos  
para la Salud Pública”

**Memoria de Tesis Doctoral**

**Presentada por M<sup>a</sup> Teresa Fernández Rodrigo**

**para optar al grado de Doctor.**

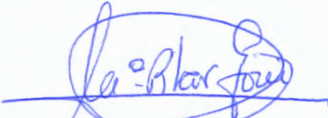
**Bajo la dirección de:**

**Dra. Pilar Goñi Cepero y Dr. Antonio Clavel Parrilla**

## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. Pilar Goñi Cepero, profesora de la Facultad de Medicina de Zaragoza y el Dr. Antonio Clavel Parrilla, Catedrático de Parasitología, ambos pertenecientes al Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza, como directores de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza. Asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública" que corresponde al proyecto de tesis aprobado con fecha 7/9/2012 y realizada por M<sup>a</sup> Teresa Fernández Rodrigo en el Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza, autorizan su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste firmamos la presente en Zaragoza, a 11 de septiembre de 2014.



Fdo.: Dra Pilar Goñi Cepero



Fdo. Dr. Antonio Clavel Parrilla

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer a mis directores de tesis Dra. Pilar Goñi y al Dr. Antonio Clavel la oportunidad de realizar este trabajo. Su dirección y acompañamiento han sido insustituibles durante todos estos años y me ha dado la posibilidad de dar un giro a una parte de mi vida profesional, que nunca hubiera pensado. Para ellos también mi cariño y admiración.

Me quiero dirigir a la Dra. Goñi que además ha demostrado ser una amiga que me ha ayudado a perseverar, y de la que poco a poco he aprendido no sólo los conocimientos científicos, que tiene muchos, sino la inquietud e ilusión por la investigación.

A la Dra. Encarna Rubio, que con sus conocimientos y claridad de ideas me ha apoyado con sus consejos.

Quiero también agradecer la colaboración de los Departamentos de la Universidad de Zaragoza con los que hemos trabajado en diferentes proyectos (Tecnologías del Medioambiente, Patología animal, Bioquímica y Biología Molecular y Celular y Servicios de Oftalmología y Microbiología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”) y al personal del Instituto Municipal de Salud Pública y a la sección de deportes del Ayuntamiento de Zaragoza, por su colaboración en este trabajo. También quiero agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad, a la Diputación General de Aragón y a la Universidad de Zaragoza la financiación de este trabajo.

Al Dr. Gómez-Lus, con el que tenemos en momentos de descanso del trabajo alguna charla interesante, divertida o preocupada por lo que nos rodea. A todos los compañeros y técnicos de laboratorio del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, de los que he aprendido mucho y me han ayudado siempre que les he requerido.

A todos mis queridos compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias de la Salud, que forman parte de mi familia (como dicen mis hijos) y los quiero como tal,

por su cariño, confianza y palabras de ánimo constantes. Es una seguridad saber que estáis siempre ahí.

A mis amigos que siempre me han mostrado la confianza y han creído en mí, además de que supongo que aunque no fuera doctora me querrían igual, como soy.

A mi familia, mi marido Juan que me demuestra su amor y apoyo en todo momento y del que también he aprendido la importancia de la constancia. A mis hijos Juan, Pablo y Marta que son el motor y alegría de mi vida y mi orgullo por buenos, guapos, listos, educados y porque me quieren, les quiero agradecer su comprensión en algunos momentos de sobrecarga de trabajo y preocupación, cuando les he dirigido un mal gesto o una riña, sin demasiado motivo.

A mis cuñados y cuñadas, mi suegra que siempre, siempre me han hecho sentir como una hermana e hija para ellos y que por supuesto lo son para mí. A mis cinco hermanas que hemos sufrido en los últimos años la pérdida de nuestros padres y tíos queridos. Por los ratos de risas, los encuentros y desencuentros, reconciliaciones y es que somos como niñas....os quiero agradecer vuestras palabras de cariño que han aumentado mi autoestima cuando lo he necesitado. Y a mis sobrinos de los que estoy muy orgullosa porque son geniales. No me faltéis nunca.

Y por supuesto expresar mi recuerdo más cariñoso y emotivo a todos los que me cuidáis en el cielo papá, mamá, tía Tere, tío José María, Pipo, y Toñuco. No dejéis de hacerlo. Se os echa mucho de menos.



**Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:**

- Proyecto FIS 2009/0372 Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Diputación General de Aragón
- Grupo Consolidado B82 “Protozoosis entéricas de interés económico y sanitario”. Diputación General de Aragón.
- Proyecto UZ2013-FIS-02. Universidad de Zaragoza.

# ÍNDICE

---

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1. Características de las amebas de vida libre.....	13
1.1 Hábitat.....	13
1.2 Ciclo de vida.....	14
1.3 Morfología celular.....	16
1.4 Función ecológica.....	18
1.5 Clasificación según su locomoción.....	18
1.6 Taxonomía.....	23
1.7 Técnicas de cultivo e identificación.....	24
2. Géneros patógenos de amebas de vida libre.....	27
2.1 Género <i>Acanthamoeba</i> spp.....	27
2.1.1 Características principales.....	27
2.1.2 Ciclo de vida y transmisión.....	29
2.2 Género <i>Naegleria fowleri</i> .....	31
2.2.1 Características principales.....	31
2.2.2 Ciclo de vida y transmisión.....	32
2.3 Género <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	35
2.3.1 Características principales.....	35
2.3.2 Ciclo de vida y transmisión.....	35
2.4 Género <i>Hartmannella</i> spp.....	38
2.4.1 Características principales.....	38
3. Enfermedades causadas por amebas de vida libre.....	40
3.1 Meningoencefalitis primaria amebiana.....	40
♦Manifestaciones clínicas y vía de penetración.....	40
♦Epidemiología.....	41
♦Diagnóstico.....	41
♦Tratamiento.....	42

3.2 Encefalitis granulomatosa amebiana.....	43
♦Manifestaciones clínicas y vía de penetración.....	43
♦Epidemiología.....	44
♦Diagnóstico.....	45
♦Tratamiento.....	46
3.3 Queratitis y queratoconjuntivitis por <i>Acanthamoeba</i> .....	46
♦Manifestaciones clínicas y vía de penetración.....	46
♦Epidemiología.....	48
♦Patogenia.....	48
♦Diagnóstico.....	50
♦Tratamiento.....	50
3.4 Acanthamebiosis cutánea.....	53
♦Manifestaciones clínicas y vía de penetración.....	53
♦Diagnóstico.....	54
♦Tratamiento.....	54
4. Interacción entre AVL y bacterias patógenas.....	55
4.1 Bacterias resistentes a las amebas.....	55
4.2 Consecuencias para la salud pública.....	57
4.2.1 <i>Legionella pneumophila</i> .....	57
4.2.2 <i>Mycobacterium</i> spp.....	61
4.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	62
4.2.4 Cianobacterias tóxicas.....	63
5. <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia duodenalis</i> .....	66
5.1 <i>Giardia</i> spp.....	66
5.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	67
6. Justificación del estudio: El agua como reservorio de AVL y otros microorganismos patógenos.....	70
6.1 Marco conceptual.....	70
7. Medidas de prevención y control.....	74
7.1 Normativa sobre el control y análisis del agua de piscinas y fuentes ornamentales.....	75
7.1.1 mantenimiento de bañeras y piscinas de hidromasaje de uso colectivo.....	77
7.1.2 medidas preventivas en fuentes ornamentales.....	77

<b>II. OBJETIVOS</b> .....	79
Objetivo General.....	80
Objetivos específicos.....	80
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	82
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE.....	83
1. Muestras de agua.....	84
1.1 Condiciones de la toma de las muestras.....	84
A.- Muestras procedentes de aguas de red, consumo doméstico o industrial.....	.84
B.- Muestras procedentes de aguas recreativas.....	88
1.2 Temporalización .....	94
2. Procesamiento de las muestras de agua.....	95
2.1 Medios de cultivo.....	95
2.2 Condiciones de cultivo.....	95
3. Identificación de los aislamientos de AVL.....	97
3.1 Identificación morfológica.....	97
3.2 Obtención de clones.....	97
3.3 Identificación por técnicas de biología molecular.....	98
3.3.1 Extracción de ADN para AVL.....	99
3.3.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	100
♦ PCR para identificación y genotipificación de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	102
1. PCR del amplicón ASA.S1 del gen 18S rADN.....	102
2. PCR <i>Acanthamoeba</i> spp. 18S rADN.....	104
♦ PCR para AVL.....	105
1. PCR de la región conservada del gen 18S rADN...	105
♦ PCR para la identificación y genotipificación de <i>Naegleria</i> spp.....	106
1. PCR para la región ITS y 5.8S rADN.....	106
♦ PCR para Eukariotas.....	107
3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	110
3.3.4 Visualización.....	111
3.3.5 Purificación del producto de PCR.....	111

3.3.6 Visualización.....	112
3.3.7 Secuenciación.....	112
3.3.8 Análisis filogenético.....	112
ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA DEL GÉNERO <i>ACANTHAMOEBA</i> SPP. Y <i>HARTMANNELLA</i> SPP.....	114
1. Selección de la muestra.....	114
2. Muestras en medio axénico.....	115
3. Prueba de osmotolerancia.....	116
4. Prueba de termotolerancia.....	117
5. Ensayo “ <i>in vivo</i> ” de virulencia de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	119
MICROORGANISMOS PATÓGENOS ALBERGADOS EN EL INTERIOR DE LAS AVL.....	122
1. Muestras estudiadas.....	122
2. Pentaplex- nested PCR.....	124
IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS EN AGUAS DE PISCINAS: <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Giardia duodenalis</i> .....	128
1. Muestras de agua estudiada y extracción de ADN.....	128
2. Identificación morfológica por microscopía óptica de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	128
3. Técnicas moleculares para la identificación de <i>Cryptosporidium</i> spp.	129
4. Técnicas moleculares para la identificación de <i>Giardia duodenalis</i> ...	131
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	134
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	138
<b>A. Resultados agua de Red</b> .....	139
1. Muestras positivas y negativas para AVL.....	140
2. Distribución de AVL según género.....	142
3. Identificación de bacterias patógenas endosimbiontes de AVL.....	146
<b>B. Resultados aguas recreativas</b> .....	149
1. Cultivo de AVL en agar no nutritivo.....	151
1.1 Influencia del tipo de instalación en la presencia de AVL.....	152
A. Piscinas cubiertas.....	153
B. Piscinas al aire libre.....	154
1.2 Influencia del lugar de la toma de la muestra.....	156
1.3 Influencia de las características físico-químicas.....	156
2. Proporción de AVL según géneros.....	159
2.1 Tipo de instalación.....	160

2.2 Tipo de vaso y características físico-químicas del agua.....	161
A. Piscinas cubiertas.....	162
B. Piscinas al aire libre.....	163
3. Estudio filogenético de las cepas del género <i>Acanthamoeba</i> .....	168
4. Virulencia de las amebas potencialmente patógenas de piscinas...	170
4.1 Termotolerancia.....	170
4.2 Osmotolerancia.....	172
4.3 Ensayo de patogenicidad “ <i>in vivo</i> ” .....	172
5. Identificación de bacterias endosimbiontes de las amebas caracterizadas.....	176
5.1 Relación de las bacterias con el tipo de instalación, tipo de vaso y lugar de la toma de la muestra.....	177
5.2 Relación con las características físico-químicas del agua.....	180
6. Géneros de bacterias endosimbiontes.....	182
7. Resultado del estudio de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp. y nematodos en aguas recreativas.....	184
8. Resultado de la identificación de microorganismos patógenos en el agua, por cultivo microbiológico.....	186
<b>C. Muestras clínicas.....</b>	<b>190</b>
<b>D. Relación filogenética entre todas las amebas objeto de estudio.....</b>	<b>193</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>195</b>
A. Aguas de red.....	196
B. Aguas recreativas.....	212
C. Muestras clínicas.....	232
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>234</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>239</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>274</b>

# I. INTRODUCCIÓN

# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE

### 1.1 Hábitat

El nombre de "ameba" se deriva de la antigua palabra griega *amoibé*, que significa "el cambio" que hace referencia al aspecto cambiante de este microorganismo cuando se mueve.

Las amebas son protistas que se mueven y alimentan por medio de la corriente citoplasmática o por medio de pseudópodos. Este método único de locomoción se denomina movimiento ameboide. También se caracterizan por tener una forma irregular que varía constantemente.

El grupo de los protistas ameboides comprenden un grupo extenso y muy diverso con más de 15.000 especies descritas. La mayoría son de vida libre, se consideran ubicuos en la naturaleza ya que se pueden encontrar en casi cualquier hábitat húmedo o acuático, aeróbico o anaeróbico.

Las amebas de vida libre (AVL), son capaces de vivir como parásitos o como microorganismos de vida libre, y son denominados así, porque no dependen de un solo hábitat para vivir. Han sido aisladas en suelos, aire, mar, piscinas, agua de bebida, lentes de contacto, soluciones de limpieza de lentes, equipos de diálisis, torres de refrigeración, agua caliente sanitaria, entre otras procedencias (Rivera et al., 1987; Mergeryan, 1991; Szenasi et al., 1998, Shoff, 2008; Dendena et al., 2008; Trabelsi et al., 2010). También han sido descritas como parásitos oportunistas alcanzando en las últimas décadas gran importancia por su capacidad para producir enfermedades en el hombre, sobre todo en aquellos con inmunodeficiencia. La primera



observación de las AVL como posibles patógenos, fue realizada por Culbertson y colaboradores en 1958.

El efecto en el sistema inmune del contacto del ser humano con estos microorganismos, se demuestra en estudios realizados en Nueva Zelanda e Inglaterra, en los que se identifican en la población anticuerpos frente a *Acanthamoeba*, en el 100% de los individuos en Nueva Zelanda, y en más del 85% en los de Londres (Brindley et al., 2009; Cursons et al., 1980).

La incidencia de enfermedades causadas por AVL no es muy elevada, aunque también es cierto que el diagnóstico, en pocas ocasiones, alcanza a identificarlas como agentes causantes de la infección por lo que dicha incidencia podría estar infravalorada. Además, las enfermedades que producen son de difícil tratamiento o mortales, por desconocer cómo combatirlos o porque el diagnóstico no es lo suficientemente rápido.

Es necesario mencionar que existen multitud de géneros y especies de amebas de vida libre, algunos de ellos todavía sin clasificar, todos ellos con una importante función de mantenimiento de los nichos ecológicos en los que habitan. Sin embargo, solo unos pocos de estos géneros y especies han sido descritos hasta la fecha como causantes de enfermedad en el hombre. Entre ellos se encuentran *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Paravahlkampfia*, *Balamuthia* y *Sappinia* y es a éstos a los que presta mayor atención en este trabajo.

### **1.2. Ciclo de vida**

La mayoría de las AVL tienen al menos dos estadios de desarrollo: trofozoíto y quiste. El trofozoíto es el estado metabólicamente activo, se alimenta de bacterias y se multiplica por fisión binaria. Otras como el género *Naegleria*, presentan tres estadios morfológicos en su ciclo de vida: ameboide, quístico y flagelado. La forma flagelada se presenta cuando la

ameba se encuentra en un medio sin nutrientes; es transitoria, el organismo no se alimenta ni se divide y después de un tiempo, cuando se encuentra nuevamente en un ambiente adecuado, regresa a su forma ameboide.

El quiste es la forma de resistencia. Generalmente tiene 2 capas: una externa o ectoquiste y otra interna o endoquiste; una tercera capa, el mesoquiste, está presente en algunas especies. Estas estructuras quísticas pueden explicar por qué el quiste es tan resistente a biocidas usados para la desinfección de broncoscopios y lentes de contacto, también a la cloración y esterilización en sistemas de agua. Condiciones adversas de pH, presión osmótica y temperatura causan el paso de trofozoíto a quiste y el enquistamiento también ocurre cuando los requerimientos alimenticios no están cubiertos. El protozoo se desenquista nuevamente, cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, por lo cual su abundancia y diversidad dependen de la estación del año, la temperatura, la humedad, precipitaciones y disponibilidad de nutrientes (Schuster & Visser, 2004) (Greub & Raoult, 2004).



Fig. 1 Imagen de quistes y trofozoítos del género *Acanthamoeba* procedente de una muestra clínica.

### 1.3 Morfología celular

Las amebas son organismos unicelulares. Constan de protoplasma, en el que se puede encontrar el citoplasma y un núcleo. Este último está rodeado por la membrana nuclear, mientras que el citoplasma está rodeado por la membrana celular, que sirve como un límite mecánico y químico y tiene una importante función en el intercambio de materiales con el medio ambiente, tales como residuos, agua, oxígeno, y otros productos químicos necesarios para su supervivencia.

El citoplasma contiene todos los organelos: el aparato de Golgi, las mitocondrias y del retículo endoplásmico. Estos orgánulos pueden aparecer como manchas oscuras, pero no son identificables microscópicamente.

Otros orgánulos, que se describen a continuación, sí son observables microscópicamente:

#### *Vacuola contráctil*

Es un orgánulo muy fácilmente observable y sirve para mantener el equilibrio osmótico, expulsando del citoplasma el exceso de agua (Bowers & Korn, 1973). Normalmente las amebas contienen una sola vacuola contráctil aunque podrían tener hasta dos, y en las especies marinas está ausente.

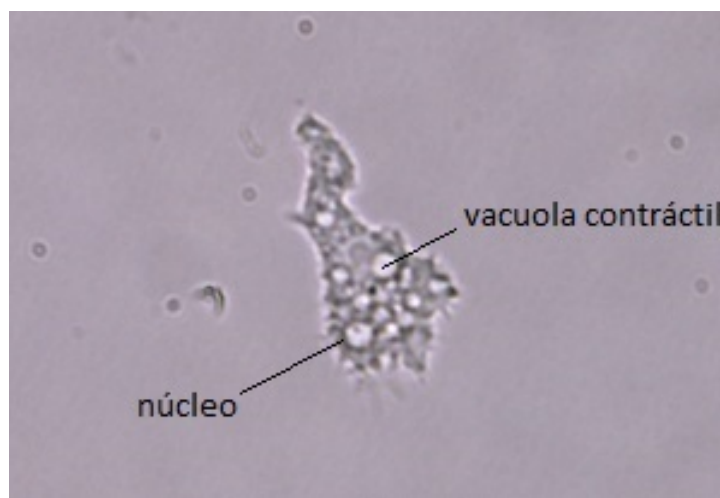


Fig. 2 Morfología celular: protoplasma

*El núcleo*

Es el principal orgánulo de la ameba ya que su función es dirigir las actividades celulares. Tienen generalmente una forma esférica aunque algunas especies pueden tenerlo fragmentado, lobulado o granular y poseen un nucléolo.

Normalmente las amebas tienen un solo núcleo, aunque algunas especies pueden ser multinucleares.

*Pseudópodos*

Son una extensión temporal del citoplasma y la forma y estructura de éstos, son importantes caracteres para la clasificación taxonómica. A continuación se muestra una imagen descriptiva de dichos pseudópodos.

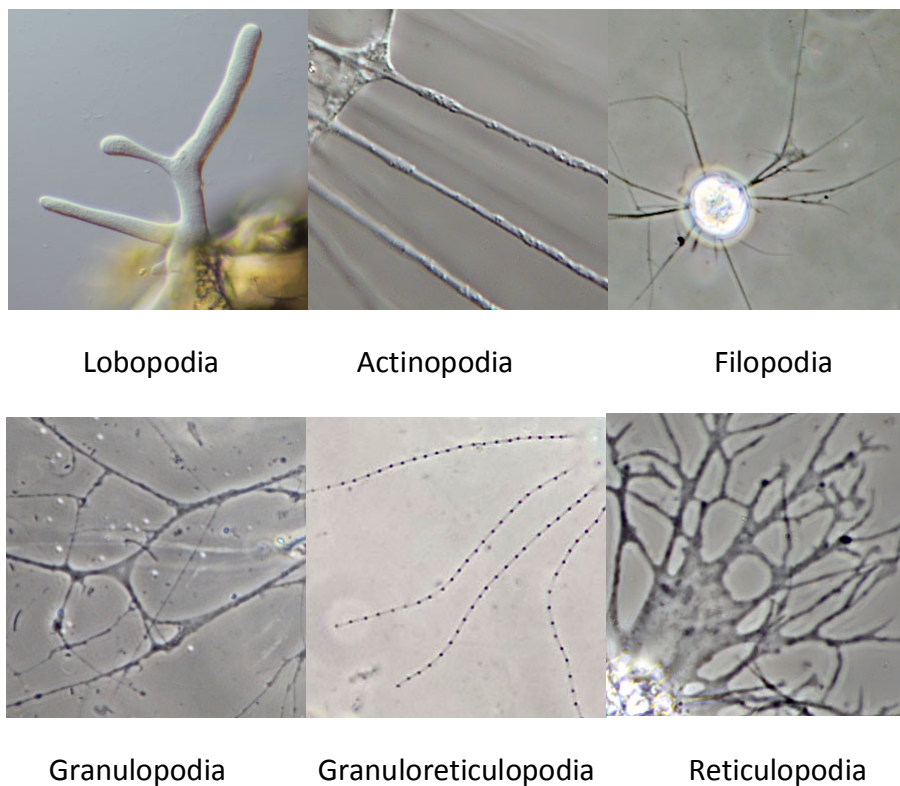


Fig.3 Clasificación de las amebas según la morfología de los pseudópodos

### **1.4 Función ecológica**

Las amebas de vida libre junto con los flagelados y ciliados, tienen dos importantes funciones ecológicas:

- ✓ Influyen en la estructura de la comunidad microbiana.
- ✓ Mejoran el reciclaje de nutrientes.

Ambas actividades están asociadas con el hecho de que las amebas se alimentan de bacterias del suelo, de manera que regulan la población bacteriana y son responsables de hasta el 60% de la reducción total de la población bacteriana (Siddiqui R & Khan NA, 2012).

### **1.5 Clasificación según su locomoción**

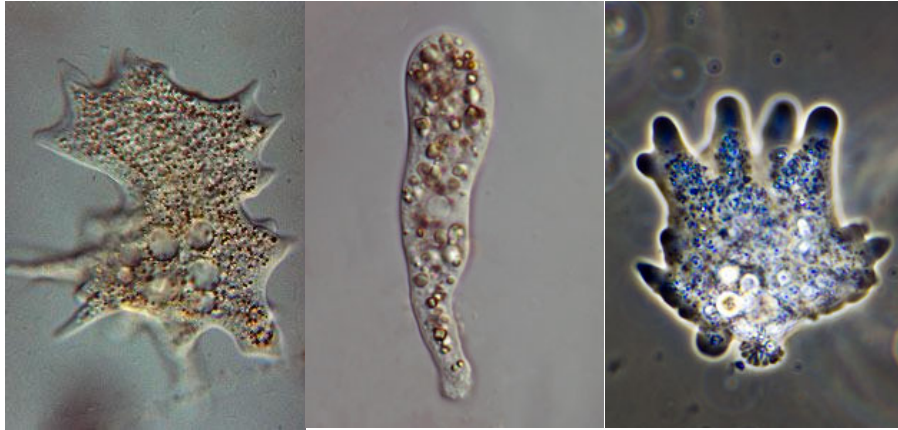
La observación del movimiento de las amebas, es el primer paso para su identificación ya que para la clasificación por las medidas, los cultivos han de tener de 5 a 6 días de antigüedad y aun así, el tamaño puede variar en cultivo o en su hábitat natural. El núcleo y el quiste suelen ser más constantes. La velocidad en el movimiento se mide en  $\mu\text{m}/\text{min}$  a 20-22 °C. Las llamadas amebas Loboseae (phylum Rhizopoda, clase Lobosea, subclase Gymnamoebia) son organismos que tienen movimientos ameboides y su cuerpo no tiene una forma constante, por lo cual las formas de locomoción utilizadas por la ameba (forma y organización citoplasmática durante el movimiento) es el carácter más representativo.

Cualquier forma de locomoción puede ser caracterizada por un conjunto de rasgos discretos. Esta combinación de rasgos es suficiente para una descripción de las especies conocidas.

Smirnov A et al., en 2005, describieron los patrones de organización de diferentes formas de locomoción, basados en los criterios de Page, y definiendo 19 morfotipos para las AVL conocidas, de la subclase Gymnamoebia. Dichos morfotipos son los siguientes:

- Politáctil.- Polipodial, con abundantes pseudópodos perfectamente separados y de diferente tamaño, los cuales se forman de la parte anterior del cuerpo.
- Ortotáctil.- Cuerpo elongado con cortes transversales en forma de campana y con arrugas laterales siempre presentes.
- Palmado.- Polipodial, con numerosos seudópodos, aproximadamente de igual tamaño, los cuales se forman de la parte basal del cuerpo. Presenta un uroide (cola) fasciculado.
- Monotáctil.- Monopodial, de cuerpo subcilíndrico con corte transversal circular, sin arrugas y nunca presenta uroide.
- Rhizomonotáctil. - Monopodial, presenta un uroide bien diferenciado.
- Estriado.- Aplanada, ovoide u oblonga con contorno regular y con abundantes pliegues dorsales casi paralelos.
- Rugoso.- Aplanada, ovoide u oblonga con contorno más o menos regular, pliegues dorsales y laterales y arrugas usualmente irregulares.
- Lingulado.- Aplanada, oblonga con contorno más o menos regular sin pliegues ni arrugas.
- Lanceolado.- Aplanada, en forma de lanceta con distintos aplanamientos laterales, sin pliegues ni arrugas.
- Espinolada.- Aplanada, delgada y muy elongada, con forma de palillo, con una profunda zona anterior hialina.
- En abanico.- Aplanada, semicircular, en forma de abanico o espátula, con contorno más o menos regular, con hialoplasma anterior y anterolateral aplanados y bien diferenciados, un espeso granuloplasma posterior, borde anterior completo, sin subpseudópodos.
- Mayorellia.- Aplanadas, irregulares, triangulares u oblongas con borde anterior hialino, con algunos subpseudópodos embotados, cónicos, hialinos y de longitudes similares.

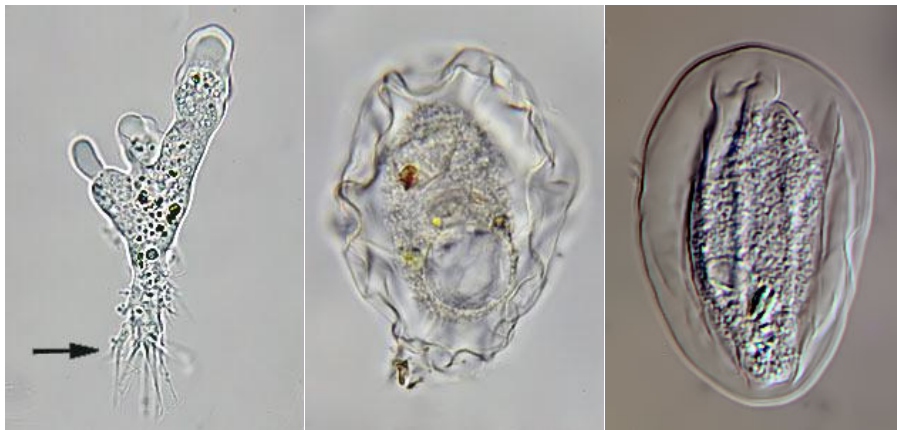
- Dactilopodio.- Aplanada, irregular, triangular o de forma variable, con una amplia zona anterior hialina, con dactilopodios frontales o frontolaterales bien diferenciados.
- Flabelado.- Aplanadas, irregulares, flabeladas con una proporción longitud/anchura cerca de 1, prominente hialoplasma anterior, con borde frontal desigual, sin subpseudópodos, aunque pueden aparecer filamentos uroidales.
- Paraflabelado.- Aplanada, irregular, flabelada con subpseudópodos muy cortos, estrechos formados a partir de la zona hialina arrastrando filamentos uroidales.
- Paramoeba.- Aplanadas en forma irregular semejante a un abanico proporción largo/ancho mayor a 1. Lóbulo hialoplásmico anterior aplanado con borde irregular. Con algunas proyecciones de la zona hialoplásmica muy cortas y embotadas, los cantos dorsales longitudinales son comunes y no hay uroide.
- Vexilliferia.- Aplanada, irregularmente triangular con pocos subpseudópodos cortos y algunos largos, delgados y afilados, producidos de la zona hialina anterior.
- Acanthopodio.- Más bien aplanadas, de contorno algo irregular, numerosos subpseudópodos cortos, delgados, flexibles y afilados, a veces ramificado cerca de su base y formados a partir de un lobópodo hialino amplio.
- Reticulado.- Aplanada y dilatada, reticulada con logoreticulopodios.



**politáctil**

**ortotáctil**

**palmado**



**monotáctil**

**rhizomonotáctil**

**estriado**

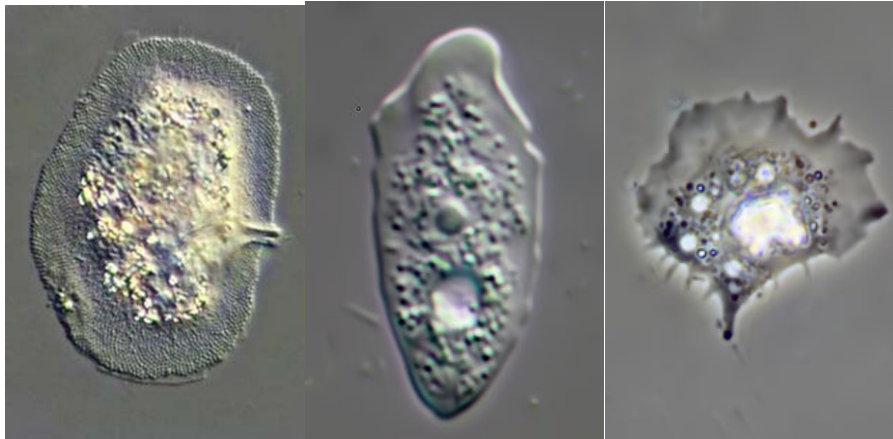


**rugoso**

**lingulado**

**lanceolado**

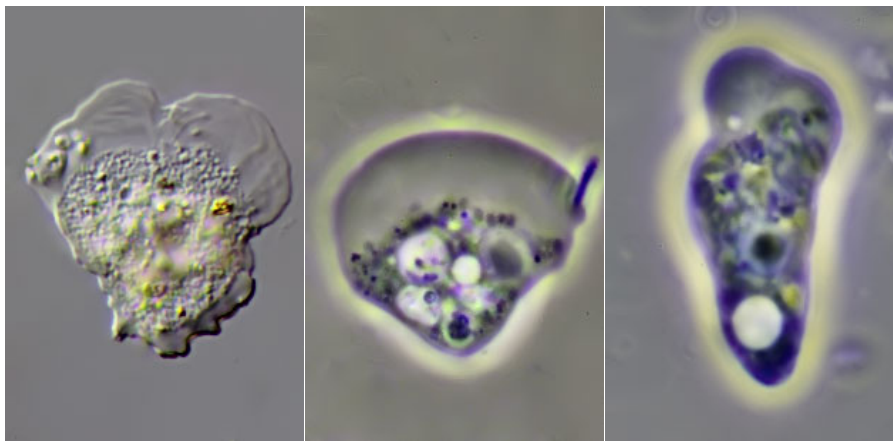




**en abanico**

**mayorellia**

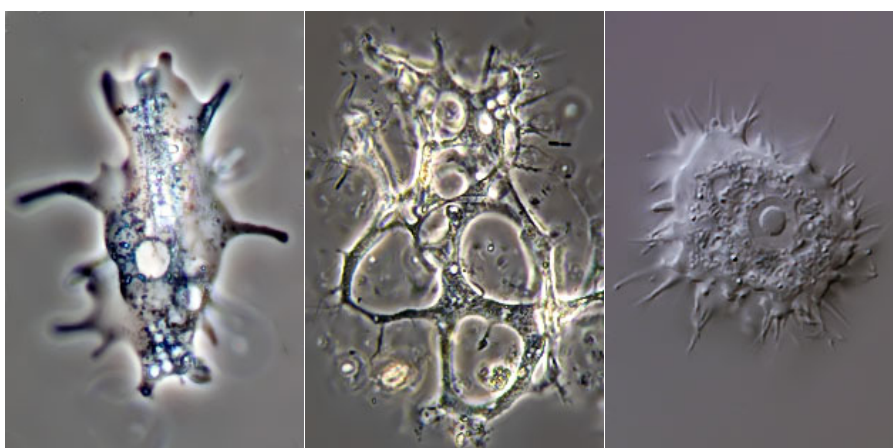
**dactilopodio**



**flabelado**

**paraflabelado**

**paramoeba**



**vexillifera**

**reticulado**

**acanthopodio**

Fig. 4 Clasificación en morfotipos según su locomoción.(Smirnov et al., 1999)

## 1.6 Taxonomía

El sistema para la clasificación de las AVL sigue el protocolo indicado por Page en 1988, que es una modificación de la pauta propuesta por este mismo autor en 1987 para Rhizopoda (Page, 1988).

A continuación se clasifican taxonómicamente aquellas amebas consideradas patógenas para el hombre y animales.

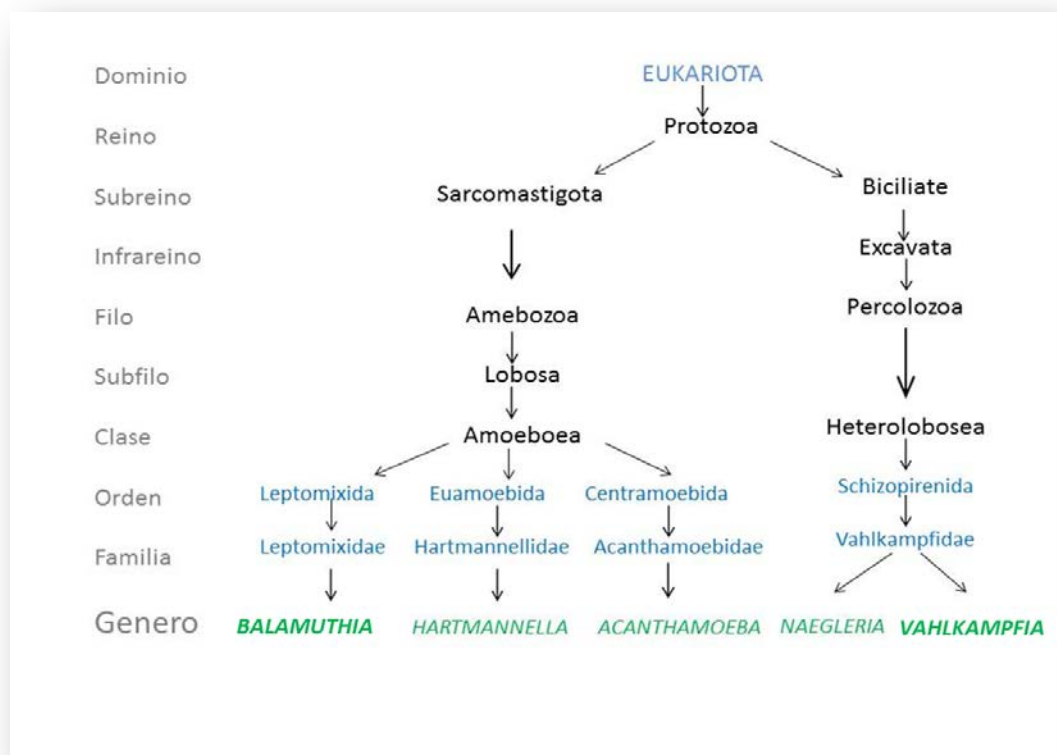


Fig. 5 Clasificación taxonómica de AVL potencialmente patógenas

La taxonomía de las AVL, está sujeta a cambios, que reflejan los nuevos datos derivados de estudios de secuenciación genómica (Schuster & Visversvara, 2004b; Smirnov et al., 2011).

## 1.7 Técnicas de cultivo e identificación

El desarrollo, a lo largo del tiempo, de técnicas para el cultivo e identificación de las amebas de vida libre, supone una gran ventaja para experimentar con cepas ambientales y clínicas. Los cultivos de amebas permiten observar su comportamiento, obtener el número de células requeridas en determinados experimentos, estudiar la sensibilidad ante diferentes compuestos o con parámetros físicos que podemos controlar y la interacción de éstas con otros microorganismos.

El primer cultivo en medio sólido para AVL, fue descrito por Singh en 1946, habiendo sido modificado posteriormente tanto en la composición del medio de cultivo, como de los nutrientes que podían ser más adecuados (Drozanski & Drozanska 1961, Culberston 1965). Así mismo, la modificación del estado de las bacterias que suponían el sustrato nutritivo de activo, a inactivo por calor, permitió evitar las interferencias que se producían entre los microorganismos (Culberston et al., 1965).

Actualmente el medio más adecuado utilizado para el cultivo de *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* y otras AVL no patógenas, es el medio no nutritivo (ANN), cubierto con la bacteria gram-negativa inactivada (*E. coli*), sobre la que se siembran las amebas, incubando a 30°C durante 48-72 horas. *Balamuthia mandrillaris* sin embargo, necesita de un medio de tejido celular para su desarrollo (Schuster 2002).

Otro medio que resulta adecuado para el desarrollo y posterior experimentación con AVL es el medio-axénico (PYG) que al encontrarse libre de bacterias, evita interferencias. También la fórmula del medio PYG, ha ido sufriendo distintas modificaciones a lo largo del tiempo (Proca Ciobanu et al., 1975; Drozanski et al., 1979)

Sin embargo, en este medio sólo son capaces de crecer algunas cepas del género *Acanthamoeba* y *Naegleria* ya que los requerimientos nutricionales varían entre géneros y cepas.

Las técnicas de observación de AVL, para la identificación morfológica son la microscopía óptica y la microscopía electrónica, que permite identificar la interacción con otros microorganismos, como bacterias patógenas (*Legionella spp.*) que alberga en su interior y protege de condiciones adversas y desinfectantes (Jean & Lorch 1967).

Hasta el momento, estas técnicas enunciadas permiten la identificación morfológica y su clasificación según las claves de Page 1988, pero son las técnicas moleculares las que permiten, mediante la amplificación de fragmentos específicos, identificar y realizar estudios epidemiológicos de género, especie, genotipo y subgenotipo. Los primeros informes incluyen técnicas como RFLP de ADN mitocondrial (De Jonckheere et al., 1988; Kilvington et al., 1991). Tomando como ejemplo el caso de *Acanthamoeba*, Johnson et al., en 1990, determinaron la secuencia parcial del rRNA subunidad pequeña de algunos aislamientos, mostrando un alto grado de variabilidad en la secuencias de 18S rRNA. (Johnson et al., 1990). En 1992, Vodkin et al., diseñaron una PCR que además de diferenciar las especies, intenta diferenciar su patogenicidad (Vodkin et. Al., 1992). Más tarde Gast et al., determinaron la secuencia genética completa de la subunidad de ARN ribosomal nuclear (RN) y propuso un sistema de clasificación basado en esta secuencia (Gast et al., 1996).

Utilizando este parámetro, Stothard et al. en 1998, clasificaron los géneros de *Acanthamoeba* en 53 especies y 12 genotipos basándose en el análisis de un fragmento del 18S rDNA (2300 a 2700 pb) denominado fragmento diagnóstico DF3 (Stothard et al., 1998; Stothard et al., 1999). Hasta el momento, se han descrito 18 genotipos diferentes (T1- T18) de

*Acanthamoeba* ( Stothard et al., 1998; Horn et al, 1999; Gast et al , 2001; Hewett et al., 2003; Corsaro et al., 2010; Nuprasert et al., 2010; Qvarnstrom et al., 2013). La mayoría de los aislamientos clínicos y ambientales pertenecen al genotipo T4, que también presenta la mayor variabilidad genética.

## 2. GENEROS PATÓGENOS DE AMEBAS DE VIDA LIBRE

### 2.1 Género *Acanthamoeba* spp.

#### 2.1.1 Características principales

*Acanthamoeba* es la ameba más frecuentemente aislada en el suelo y en el agua y en general en ambientes húmedos, y por ello es considerada uno de los protozoos más ubicuos y por lo tanto está en permanente contacto con el ser humano y los animales. Su ciclo se compone de dos fases: trofozoíto y quiste.

El trofozoíto mide entre 15 a 35  $\mu\text{m}$ , posee citoplasma, mitocondrias, lisosomas, ribosomas y vacuolas. Su movilización es a través de pseudópodos filamentosos (acanthopodios) y la pared del quiste le da una forma estrellada. Poseen núcleo central con un nucléolo prominente y redondo. (Castrillón & Orozco, 2013).

El quiste mide entre 15 a 28  $\mu\text{m}$  y contiene una doble pared, la cual se forma cuando las condiciones del medio ambiente no son adecuadas, como respuesta a la desecación, al efecto de medios físicos o químicos de desinfección y a la presencia de antimicrobianos (Aksozek et al., 2002; Khunkitti et al., 1998). El quiste tiene doble capa (el endoquiste y el exoquiste) y la celulosa es el principal componente de la pared (Schuster and Visvesvara et al., 2004a).

Hasta el momento hay descritas hasta 24 especies de *Acanthamoeba* spp. que se agrupan en tres grupos principales (I, II, III), atendiendo a la morfología del quiste (Page 1988; Pussard y Pons, 1977; Trabelsi et al, 2012). El más comúnmente aislado en el medio ambiente es el grupo II, cuyo quiste tiene un tamaño menor de 18  $\mu\text{m}$ . siendo el exoquiste de forma poliédrica, globular, ovoide o estrellado, y ondulado el endoquiste. A este grupo

pertenece a especies patógenas como *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*.



Fig. 6 Imagen de quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba polyphaga*

Por la dificultad de la identificación en cultivo, se ha establecido un método de clasificación por estudio molecular, analizando una región variable del 18SrRNA, según el cual las secuencias obtenidas hasta el momento dan lugar a 18 secuencias tipo.

Concretamente la región 29-1, actualmente llamada fragmento diagnóstico 3 (DF3), permite la discriminación genotípica del ASA.S1 (Booton et al., 2002).

De esta forma se han registrado los genotipos T1-T12 (Stothard et al., 1988), T13 (Horn et al., 1999), T14 (Gast, 2001), T15 (Hewett et al., 2003), T16 (Corsao y Venditti, 2010), T17 (Nuprasert et al., 2010) y T18 (Qvarnstrom et al., 2013).

Las enfermedades que producen están relacionadas principalmente con el genotipo T4, pero también encontramos en la literatura referencias de patología asociadas a los genotipos T1, T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12, T15.

### **2.1.2 Ciclo de vida y transmisión**

El trofozoíto es la forma infectante. Puede ingresar al organismo por exposición directa a la tierra, agua contaminada, o lentes de contacto. En la forma de resistencia, el quiste, pueden resistir hasta 14 días en soluciones desinfectantes. El agua y el polvo son agentes diseminadores de los quistes, que resisten muy bien el cloro y la desecación.

La penetración también puede darse por vía cutánea y vía respiratoria en individuos inmunocomprometidos, por ejemplo en UCIs. Aunque no es un hecho frecuente aislar estos microorganismos de las vías respiratorias, sí puede tener gran importancia el papel de *Acanthamoeba* como un transportador de patógenos bacterianos en el tracto respiratorio (Bradbury et al., 2014).

Las enfermedades que produce son la encefalitis amebiana granulomatosa, queratitis amebiana y acanthamebiasis cutánea.



La existencia de biofilms confiere a *Acanthamoeba* un nicho adecuado de alimento y protección lo que le permite pasar de la forma quística en la infectante, el trofozoíto, por lo que la existencia de estos biofilms en las lentes de contacto, tuberías, piscinas... supone un riesgo para la salud por facilitar la infección.

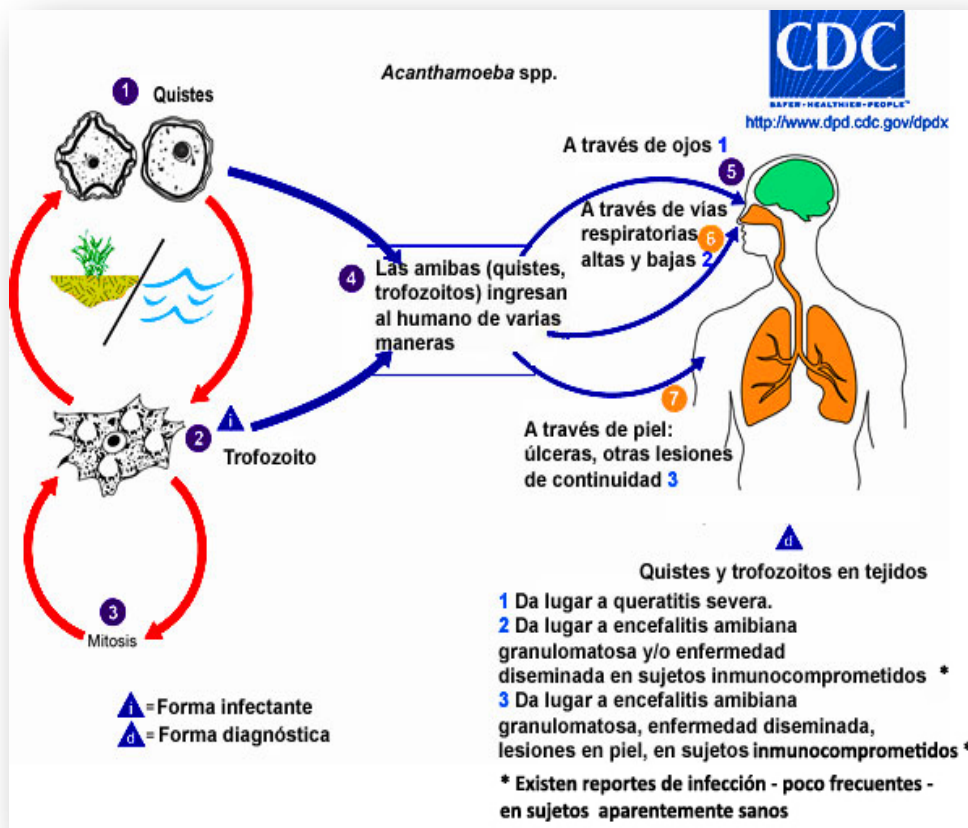


Fig. 7 Ciclo biológico de *Acanthamoeba* spp. DeDPDx/CDC

## **2.2 Género *Naegleria***

### **2.2.1 Características principales y distribución**

*Naegleria fowleri* es una ameba de vida libre que se encuentra comúnmente en ambientes de agua dulce caliente tales como aguas termales, lagos, agua mineral natural, y los balnearios. *N. fowleri* es el agente etiológico de la meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), una enfermedad mortal aguda del sistema nervioso central (De Jonckheere JF, 2004).

Anteriormente se pensaba que se trataba de una enfermedad poco frecuente pero el número de casos reportados de PAM está aumentando cada año. PAM es difícil de diagnosticar debido a que los signos clínicos de la enfermedad son similares a la meningitis bacteriana.

El desarrollo de técnicas de biología molecular, como la multiplex PCR basada en el estudio del gen 5.8S rRNA y espaciadores de transcripción internos (ITS) de diferentes tamaños, ha sido capaz de detectar simultáneamente *Naegleria fowleri* y otras especies de *Naegleria* en el medio ambiente. La aplicación clínica de la amplificación de ITS para el diagnóstico diferencial entre la PAM y la meningitis bacteriana, podría dar lugar a una prueba clínica simple, rápida y más sensible (Pelandakis & Pernin, 2002).

Siete de los ocho tipos conocidos se han detectado en Europa. Tres tipos están presentes en los EE.UU., de los cuales uno es único de este país. Sólo uno de los ocho tipos se encuentra en Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) y Japón. En el continente asiático (India, China y Tailandia) se encuentran los dos tipos más comunes, que también están presentes en Europa y los EE.UU. Está demostrado, que el patógeno *N. fowleri* evolucionó a partir del protozoo *Naegleria lovaniensis* no patógeno, en el continente

americano. Otras dos especies de *Naegleria spp.* son patógenas para ratones, pero no se ha demostrado que produzcan infección en humanos. (De Jonckheere, 2011).

### 2.2.2 Ciclo de vida y transmisión

Su ciclo vital se compone de tres estadios: trofozoíto, forma flagelada y quiste. La forma de trofozoíto mide aproximadamente de 15 a 25  $\mu\text{m}$ . El citoplasma es finamente granular y contiene múltiples mitocondrias, lisosomas y vacuolas, el núcleo es central y contiene un nucléolo central denso y esférico. La forma flagelada suele ser biflagelada aunque en ocasiones puede contener más de 10 flagelos y constituye una etapa en que la ameba no se alimenta.

El quiste es esférico mide de 8 a 12  $\mu\text{m}$  y posee una densa pared, aunque puede ser variable entre especies (*N. fowleri*, *N. jadini*, *N. gruberi*). Cuando las condiciones ambientales se tornan de nuevo favorables el desenquistamiento se produce relativamente pronto, aproximadamente 5 min. después de cultivar las amebas en ANN (agar no nutritivo) con una extensión de nutrientes desactivados por calor (Chávez-Munguía et al., 2009).



A B C  
Fig. 8 *Naegleria fowleri*; A. estadio de quiste; B. estadio trofozoíto; C. estadio forma flagelada (AP Photo/Center For Disease Control)

Las condiciones ambientales como la temperatura y la presencia de bacterias como nutrientes, son fundamentales no solo para el crecimiento y proliferación de *Naegleria* sino para su supervivencia. Estudios recientes ponen de manifiesto que el crecimiento de *Naegleria* en los biofilms (formados en agua dulce), se ve afectado de manera significativa por la temperatura y la concentración de nutrientes, a 42°C aumenta la concentración de amebas de 30-900 amebas/cm<sup>2</sup> y la proliferación está también relacionada con la proporción bacterias/ameba (10 bacterias/6 amebas) (Goudot et al., 2012).

El mecanismo de transmisión más común es la vía hídrica, por lo que la infección se lleva a cabo de forma más frecuente en aquellos individuos que toman baños de aguas contaminadas con estas amebas: lagos, piscinas, embalses, corrientes termales, manantiales. Estas amebas en algunos casos pueden penetrar a través de la lámina cribosa del etmoides, pudiendo alcanzar el cerebro y las meninges causando graves cuadros de necrosis e inflamación.

Observaciones experimentales inducen a pensar que la infección por *Naegleria* se contrae por penetración de los microorganismos a través de la nariz o a través del neuroepitelio olfatorio. *Naegleria* se ha mostrado resistente al agua poco clorada y de allí el riesgo de infección en las piscinas.

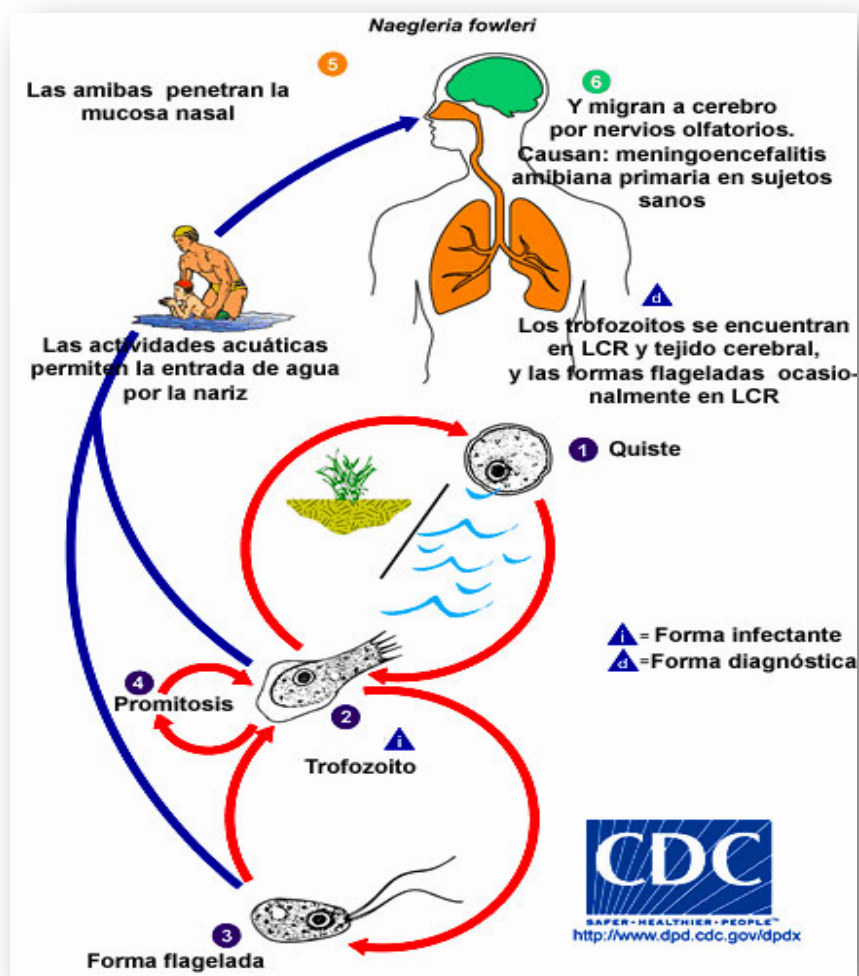


Fig.9 Ciclo biológico *Naegleria spp.* De: DPDx/CDC. Traducidos al español.

## **2.3 *Balamuthia mandrillaris***

### **2.3.1 Características principales**

Es un parásito oportunista, que causa lesiones en la piel y meningoencefalitis, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos.

El aspecto y tamaño de trofozoítos y quistes de *B. mandrillaris* es semejante al de *Acanthamoeba* spp. Sin embargo, los trofozoítos, que miden de 15 a 60 µm, tienen un peculiar retículo endoplasmático acintado, y se desplazan lentamente mediante amplias proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodios, a diferencia de las prolongaciones espinosas del género *Acanthamoeba*. Los quistes miden de 15 a 30 µm de diámetro y tienen una triple pared.

### **2.3.2 Ciclo de vida y transmisión**

El ciclo biológico de las amebas de vida libre es monoxénico simple ya que no incluye hospedadores intermediarios. No crece en medio de cultivo no nutritivo y sí lo hace en cultivos celulares.

Los casos reportados, desde que se identificó como agente causal de estas enfermedades, han sido aproximadamente 200, si bien suponen el 0,1% de las causas de encefalitis (entre las causadas por *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*). El primer caso de infección humana por *Balamuthia mandrillaris* en un paciente con SIDA fue publicado en 1991 por Anzil AP. (Oddó B David, 2006).

Pero no fue hasta 2003, cuando se aisló e identificó este género de una muestra ambiental, ya que hasta este momento sólo se habían aislado de tejidos, al realizar las necropsias. Esta muestra procedía de EEUU, del medio habitual (suelo, agua, zonas de juego) de un niño que falleció por meningoencefalitis (Schuster et al., 2003).

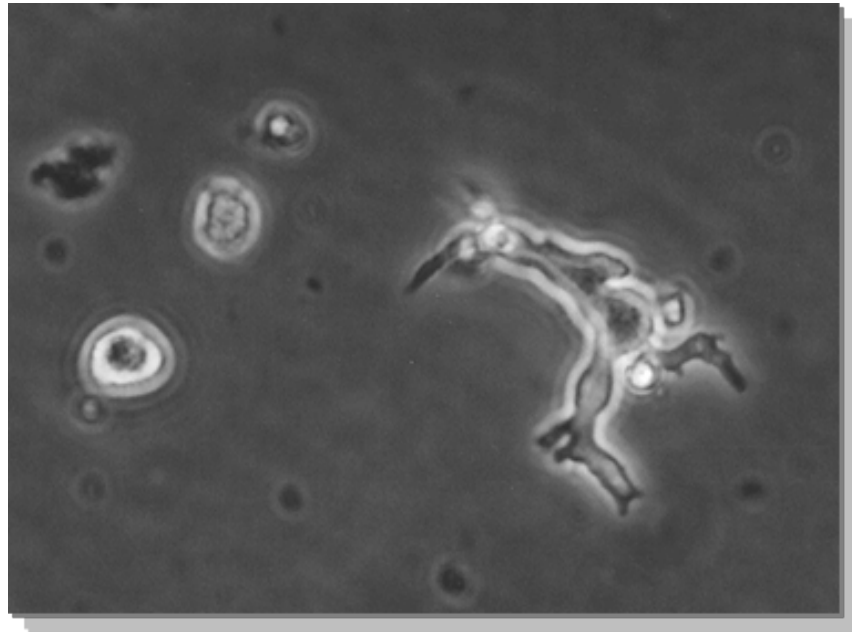


Fig.10 *Balamuthia mandrillaris* en estadio de trofozoíto. Muestra de tejido cerebral procedente de necropsia (Schuster F L et al. J. Clin. Microbiol. 2003)

Su distribución es mundial, habiendo sido documentados casos en América del Norte, América del Sur, Oceanía (Australia), Asia y Europa (Portugal y Republica Checa) aunque donde se han diagnosticado más casos es en EEUU y América latina, principalmente en Perú.

Las vías de infección son iguales a las de la *Acanthamoeba*: aire, agua y polvo. Se distinguen por lo tanto tres vías de penetración distintas: vía cutánea (por heridas en la piel), vía nasal (ingreso de aguas contaminadas, polvo) en individuos inmunocomprometidos.

Las manifestaciones cutáneas son más frecuentes que las neurológicas en América latina, sin embargo en EEUU suelen ser puramente neurológicas.

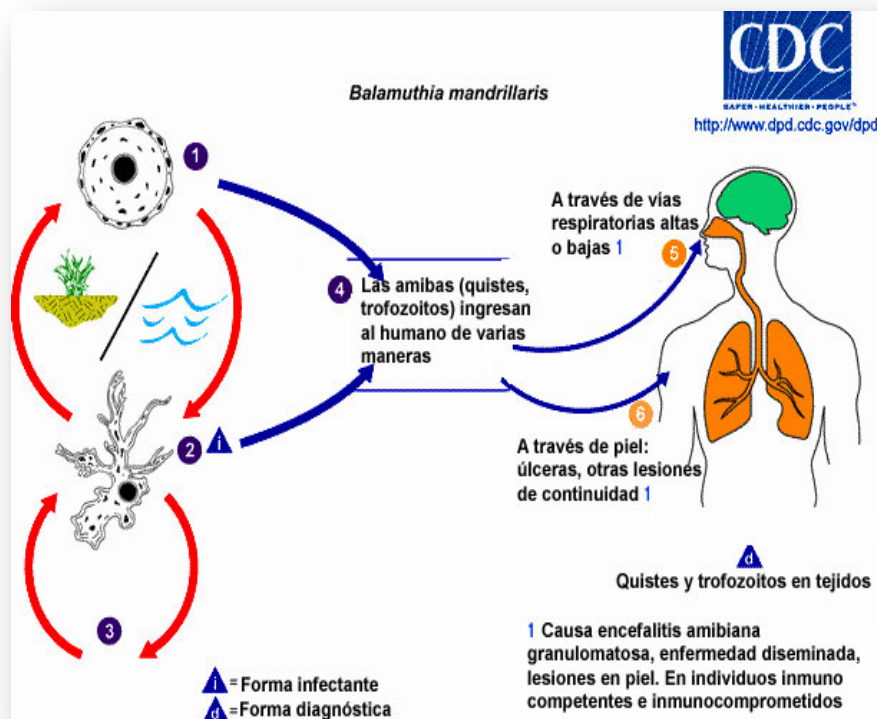


Fig. 11 Ciclo biológico de *Balamuthia mandrillaris* De: DPDx/CDC. Traducidos al español.



## **2.4 Género *Hartmannella***

### **2.4.1 Características principales**

*Hartmannella rysodes* es la primera ameba conocida como parásita del hombre. Existen escasos datos referidos a su morfología, discretamente similar a las anteriores. El género *Hartmannella spp.* fue incluido en la lista de patógenos humanos en 1994 por Weekers et al., (Weekers et al., 1994). Solo existe un caso publicado en Nigeria donde produjo meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). Posteriormente se han documentados casos de queratitis en portadores de lentes de contacto, por *Hartmannella* en coinfección con *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 1998) o *Valkampfia* (Lorenzo-Morales et al., 2007) o también con *Pseudomonas*, bacteria descrita como productora de queratitis (Dini et al., 2000; Sharma et al., 2013). En el año 2013 en Irán, se identificó un primer caso de queratitis por *Hartmannella vermiformis*, aislándose e identificando tanto morfológicamente como por PCR (Abedkhozasteh et al., 2013).

Existen no obstante, discrepancias sobre la patogenicidad de este género. Según De Jonckheere & Brown (1998), no existe certeza de dicha patogenicidad ya que no está documentado ningún experimento “*in vivo*” donde este género produzca infección en el animal de experimentación (De Jonckheere & Brown, 1998a), y sigue sin demostrarse en la actualidad. Sí que está demostrada la asociación con bacterias patógenas como *Legionella pneumophila* o *Pseudomonas*, por lo que adquieren una gran relevancia médica, ya que contribuyen a su replicación y difusión.

El género se clasifica en las siguientes especies:

*Hartmannella abertawensis*, *agricola*, *cantabrigiensis*, *crumpae*, *hibérnica*, *hialina*, *lobifera vacuolata* y *vermiformis*.

La especie *Hartmannella vermiformis* difiere de las demás especies que corresponden a este género, en que tiene una morfología diferente como por ejemplo su forma de gusano en lugar de claviforme y la tendencia a ramificarse cuando se desplaza. Para subrayar estas diferencias y la poca relación con el resto, se establece un nuevo género denominado *Vermamoeba* y especie *vermiformis* de la familia Vermamoebidae (Smirnov et al., 2011).



Fig.12 Trofozoíto de *Hartmannella vermiformis*

[http://www.diark.org/diark/species\\_list?char=H](http://www.diark.org/diark/species_list?char=H)

### **3. ENFERMEDADES CAUSADAS POR AMEBAS DE VIDA LIBRE**

La capacidad de las amebas de vida libre para causar enfermedades en humanos, ha sido reconocida desde hace más de 40 años, cuando Malcolm Fowler y Rodney F. Carter (1965) reportaron los primeros cuatro casos de meningoencefalitis producidas por estos microorganismos (Fowler and Carter, 1965). Sin embargo, son identificadas cada vez con más frecuencia, no sólo como causantes de enfermedad en inmunodeprimidos, sino también en hospedadores sanos, por lo que podrían considerarse entre las llamadas enfermedades emergentes, lo que aumenta mucho su interés.

Solamente algunas especies son patógenas: *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, y más recientemente *Hartmannella vermiformis* y *Sappinia diploidea* o *Sappinia pedata* (Carter et al., 1972; Visvesvara et al., 1993; Martinez & Visvesvara, 1997; Qvarnstrom et al., 2009).

#### **3.1 Meningoencefalitis primaria amebiana (PAM)**

Está producida por *Naegleria fowleri* y se produce más frecuentemente en niños y adultos jóvenes, los cuales tienen el antecedente de haberse bañado en piscinas o lagos en zonas cálidas.

##### ***Manifestaciones clínicas y vía de penetración***

Los síntomas de la enfermedad son los de una meningoencefalitis con fiebre, cefalea intensa, náuseas, vómitos, y signos de irritación meníngea. Se continúa con confusión, irritabilidad, episodios convulsivos, déficits neurológicos focales y coma.

Se considera que la vía de penetración de la ameba es a través de la mucosa nasal y la lámina cribosa, siguiendo el trayecto de los nervios olfatorios hasta llegar al cerebro en donde invade los bulbos olfatorios en

primer término y luego las regiones más posteriores del cerebro (Oddó B David, 2006).

El periodo de incubación se calcula entre uno y quince días y el desenlace es fatal en aproximadamente una semana. La muerte se produce por el aumento de presión intracraneal que llega a herniar el tejido cerebral. También se han encontrado lesiones en el miocardio y en el pulmón.

El CDC ha estudiado varios casos de enfermos de PAM, en los que se detectó IgM como principal anticuerpo generado en todos ellos. También se ha encontrado en personas sanas que frecuentaban medios acuáticos (Visvesvara et al., 2007).

### ***Epidemiología***

La PAM por *N. fowleri* tiene una distribución mundial, con más de 300 casos reportados a nivel internacional, sobre todo en los Estados Unidos, Australia y Europa (Gupta et al., 2009). En Francia, el primer caso de PAM causada por *N. fowleri* fue en un niño inmunocompetente de 9 años de edad con antecedente de baño en agua cálida, una semana antes de comenzar los síntomas (Travelsi et al., 2012).

### ***Diagnóstico***

En los resultados anatomopatológicos, se aprecian los hemisferios cerebrales edematizados con congestión aracnoidea. Los hallazgos característicos al examen microscópicos son necrosis y focos recientes de hemorragia en el parénquima cerebral. Los trofozoítos, se observan en el espacio perivascular pero no se evidencian formas quísticas. El exudado leptomeníngeo está compuesto de leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos y pocos macrófagos y linfocitos.

Desde el punto de vista clínico, no tiene diferencias de otras formas de meningoencefalitis causada por bacteria o virus, ni tampoco las imágenes

de la tomografía del cerebro proporcionan un diagnóstico diferencial. El único diagnóstico diferencial por microscopía, es la observación de trofozoítos de amebas (con movimiento unidireccional) que miden entre 9-14  $\mu\text{m}$  de diámetro al fresco o con tinción de Giemsa, en el líquido cefalorraquídeo.

Aunque como ya hemos comentado en apartados anteriores, el desarrollo de técnicas de biología molecular (PCR), son muy útiles para el diagnóstico diferencial (Pelandakis & Pernin, 2002).

### ***Tratamiento***

Se han utilizado varios fármacos de forma simultánea. Los de elección son la amphotericina B, miconazol y rifampicina.

### **3.2 Encefalitis granulomatosa amebiana**

Es una infección del sistema nervioso central producida por *Acanthamoeba spp.* o *Balamuthia mandrillaris*. Se caracteriza por un curso clínico insidioso y prolongado pero igualmente fatal. Esta infección, se produce principalmente, en personas inmunodeprimidas (enfermos de SIDA, diabéticos, trasplantados...) (Visvesvara et al., 2007).

#### ***Manifestaciones clínicas y vía de penetración***

Las características clínicas corresponden a las de lesiones de ocupación de espacio intracerebrales con convulsiones y déficit focales, tales como hemiparesia y lesiones de pares craneales, en especial del tercer y sexto par. Las alteraciones sensoriales, cefalea y rigidez de nuca son igualmente comunes, sin embargo, la fiebre suele ser esporádica y de bajo grado. En ocasiones se presentan cuadros de neumonitis, insuficiencia renal o hepática y sépsis (Trabelsi et al., 2012).

En la mayoría de los casos, el cuadro clínico se inicia de forma insidiosa. Las lesiones cutáneas anteceden al compromiso neurológico, constituyendo el síntoma inicial. La puerta de entrada parecen ser las lesiones en la piel, pero también podría producirse vía aérea, al inhalar los quistes (Schuster & Visvesvara, 2004b). También se ha descrito la presencia de rinitis con infección de cavidades perinasales. En una revisión que incluyó 24 pacientes con infección por *B. mandrillaris*, se describe que 92% de los casos presentaban lesiones cutáneas.

En la actualidad no existe claridad respecto a la vía de infección, se piensa que podría llegar al SNC a través de los nervios olfatorios; o bien por diseminación hematológica a partir de un foco cutáneo, pulmonar o perinatal. Esta teoría ha sido apoyada por recientes estudios en unidades de UCI, en las que se ha aislado amebas del género *Acanthamoeba spp.* de

esputos procedente de un paciente y en estudios realizados en ratones inmunodeficientes, en los cuales se ha demostrado infección a través de estas vías (Cuevas et al., 2006).

La lesión cutánea característica de la infección por *Balamuthia* corresponde a una placa no ulcerada e indolora, que se ubica en la porción central de la cara, comprometiendo generalmente la zona de la nariz, y menos frecuentemente, otras áreas como la mandíbula, abdomen y extremidades. Puede diseminarse por vía hematógica (Trabelsi et al., 2012).

### ***Epidemiología***

Los casos registrados de esta infección han ido en aumento. En Latinoamérica han sido reportados casos en Venezuela (Rodríguez et al., 1998), México y Perú considerándose estas dos últimas naciones como áreas endémicas.

En el año 2000 uno de los autores, reportó la descripción de 30 casos diagnosticados en Perú desde 1985 (Gotuzzo et al., 2000). Las edades de los pacientes oscilaban entre 6 y 63 años, aunque cerca de la mitad de los casos eran menores de 15 años, la mayoría de sexo masculino. La exposición a aguas de ríos y acequias fue frecuentemente indicada como antecedente epidemiológico (29 de 30) (Cuevas et al., 2006).

Los datos epidemiológicos no dejan muy claro si el contagio es debido a contactos ambientales únicamente o existe un componente genético, pero es curioso el dato de que un porcentaje muy elevado de pacientes en EEUU, corresponden a individuos hispanos (Schuster & Visvesvara, 2004).

Se han descrito casos de encefalitis granulomatosa amebiana por *B. mandrillaris*, tanto en pacientes inmunocomprometidos, como en inmunocompetentes y aunque se ha aislado en animales como perros,

ovejas, caballos, pero sobretodo en monos, no existe evidencia de que los animales sean reservorios de infecciones humanas.

### ***Diagnóstico***

Los resultados anatomopatológicos en la encefalitis granulomatosa amebiana, demuestra áreas multifocales de destrucción cortical, hemorragia y necrosis con células gigantes multinucleadas en los hemisferios cerebrales, los ganglios basales y el cerebelo. Dentro de estas lesiones se evidencia la presencia de trofozoítos pero también quistes de amebas.

En el diagnóstico de la Encefalitis Granulomatosa Amebiana, al ser las manifestaciones clínicas inespecíficas, son necesarios los estudios radiológicos para su detección. Los estudios radiológicos (tomografía de cráneo y resonancia magnética nuclear) demuestran lesiones debidas a ocupación de espacio, única o múltiples, hipodensas y no reforzadas por el uso de contraste que obligan a establecer diagnóstico diferencial con abscesos o tumores cerebrales, así como hematoma intracerebral.

El estudio del líquido cefalorraquídeo no demuestra anormalidades específicas en esta enfermedad, caracterizándose por pleocitosis linfocítica con elevación discreta de las proteínas y glucosa normal. Al contrario de la meningoencefalitis primaria amebiana no se detecta la presencia de amebas en el líquido cefalorraquídeo en la gran mayoría de los casos.

Por otra parte, la realización de biopsias de tejido cerebral o piel son de valor en el diagnóstico de la enfermedad porque permitirían demostrar la presencia de trofozoítos o quistes de amebas en los tejidos (Oddó B David, 2006).

La diferenciación del agente causal (*Acanthamoeba* o *Balamuthia*) debe realizarse por inmunofluorescencia.



### **Tratamiento**

Se ha utilizado para el tratamiento sulfametazina, ketokonazole, anfotericina B, clorhexidina.

### **3.3 Queratitis y queratoconjuntivis por *Acanthamoeba* (QA)**

La QA, es una enfermedad caracterizada por la inflamación y ulceración crónica de la córnea. Esta enfermedad se asocia con el uso de lentes de contacto trauma ocular y exposiciones a aguas contaminadas (Por et al., 2009).

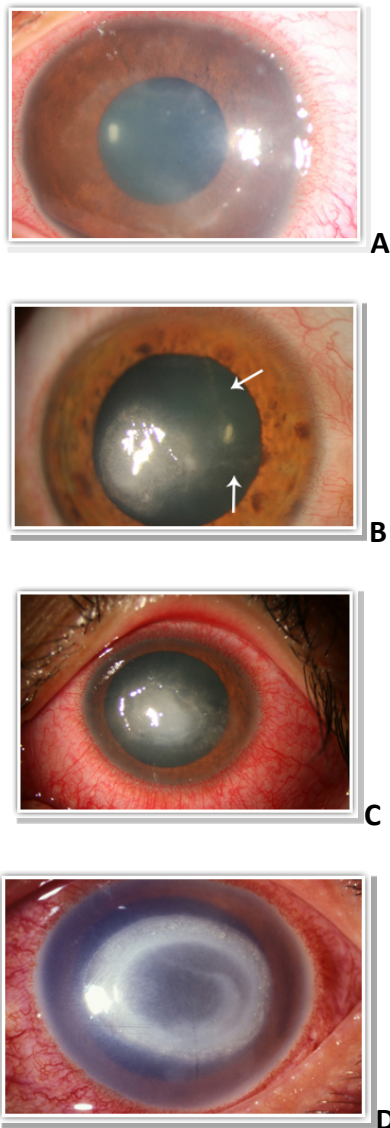
Más del 80% de los casos de queratitis por *Acanthamoeba* se producen en personas portadoras de lentes de contacto. En el estudio realizado por Hannen Hasim *et al.*, en 2012, revisaron los 19 casos de queratitis producidos en 5 años, y comprobaron que 18 eran portadores de lentes de contacto y 11 de ellos tenían antecedentes de haber tenido contacto con el agua de piscinas, mientras que 2 de ellos realizaban la limpieza de las lentes con agua corriente (Hannen Jasim et al., 2012). La incidencia de esta enfermedad no es muy elevada, sin embargo está aumentando en los últimos años, posiblemente por el aumento del uso de lentes de contacto (Graffi et al., 2013).

El agente causal aislado con más frecuencia es *A. polyphaga* aunque también otras especies han sido identificadas. Ha sido documentado el aislamiento de una ameba del género *Hartmannella* en coinfección con *Vahlkampfia* en un caso de queratitis (Lorenzo-Morales et al., 2007).

### **Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas son similares a otras formas de queratitis con dolor ocular, sensación de cuerpo extraño, conjuntiva congestiva y en

casos avanzados disminución de la agudeza visual y pérdida de ésta. La cornea dañada muestra un infiltrado epitelial que se manifiestan en forma de anillo en el estroma corneal, como consecuencia de la proliferación de células en la respuesta inmunitaria (neutrófilos y macrófagos) (Knickelbein et al., 2013).



© Copyright 1996-2013 - Instituto Barraquer de América - Bogotá D.C. / Colombia)

Fig.13 Evolución clínica de la queratitis por *Acanthamoeba*; A. Superficie corneal irregular y grisácea; B. Líneas epiteliales elevadas; C. Infiltrados estromales; D. anillo estroma corneal característico.

### ***Epidemiología***

El número cada vez mayor de casos de QA se ha observado en estudios recientes en todo el mundo, con una incidencia entre 17 y 70 casos por millón de QA en usuarios de lentes de contacto (Ku et al., 2009). El aumento significativo de QA en EEUU ha llevado al CDC, a realizar un estudio sobre esta enfermedad (Bryant et al., 2007).

### ***Patogenia***

Los trabajos experimentales acerca de la interacción de la ameba sobre la córnea, han demostrado que *Acanthamoeba spp*, produce en la córnea una queratitis necrosante progresiva. Los parásitos se adhieren firmemente al epitelio corneal, produciendo profundas grietas y exfoliación del epitelio.

En estudios *in vivo*, los parásitos atacan sólo el epitelio corneal previamente dañado, nunca el epitelio intacto, y la presencia de células de Langerhans en la córnea previene el desarrollo de las lesiones. La acción de la colagenasa, parece jugar un rol en la producción de la lesión, dada su actividad *in vitro* e *in vivo* contra el tejido corneal (Oddó B David, 2006).

Sin embargo, siendo que se trata de un microorganismo con una gran ubiquidad, la incidencia de la enfermedad no es tan elevada, lo que sugiere que la susceptibilidad del huésped es un factor que hay que tener en cuenta. Se ha investigado la presencia de anticuerpos frente a *Acanthamoeba* en las lágrimas de personas portadoras de lentes de contacto y se ha observado, que las personas sanas o asintomáticas, poseían niveles más elevados de inmunoglobulina A frente a *Acanthamoeba*, que los que desarrollaron la enfermedad (Cerva 1989, Alizadeh et al., 2001; Cursons et al., 1980).

La producción de lesión, es dependiente de la virulencia de la ameba y del estado fisiológico de la córnea. De hecho, el traumatismo corneal es

una condición inicial en la queratitis. La abrasión de la córnea está implicada en el 85% de QA en usuarios de lentes de contacto. (Trabelsi, et al. 2012).

La *Acanthamoeba*, tiene que estar en la forma de trofozoíto para producir la lesión. En un primer momento el trofozoíto se adhiere al epitelio corneal, y produce una serie de proteasas, que le permiten invadir la córnea, provocando la citolisis de ésta. La infección causa la destrucción del epitelio corneal y el estroma, la infiltración de células inflamatorias producen perforación, limbitis y escleritis, también pueden producirse por una reacción inmunológica secundaria o por propagación directa de la infección de la córnea (Khan et al., 2003).

Las proteasas son importantes factores determinantes de patogenicidad de los protozoos y citolisis de las células huésped. La producción o no de proteasas distingue como patógenas y no-patógenas, a especies del género *Acanthamoeba* (Khan et al., 2000). Sin embargo, ahora hay cada vez más pruebas de su implicación en la diferenciación celular de forma que las proteasas no solo están involucradas en el proceso de invasión y citolisis celular, sino que son igualmente importantes para la diferenciación y el resurgimiento del trofozoíto durante el desenquistamiento y en la transformación del trofozoíto en el quiste, altamente resistente. Por consiguiente, la inhibición de la expresión de las proteasas junto con el silenciamiento genético, mediante el uso de la moléculas de RNA para el bloqueo de los factores de virulencia de las amebas en su proceso de patogénesis, puede resultar útil para la resolución de la infección (Dudley et al., 2008; Lorenzo- Morales et al., 2010).

El desarrollo o no de la enfermedad en los portadores de lentes de contacto, también se ha relacionado con el tipo de soluciones de mantenimiento que se utilizan y las medidas higiénicas (Bialasiewicz et al., 2001). El uso de líquido de mantenimiento de lentes, con alto contenido en

polímeros que pueden inducir al enquistamiento,(Kliescikova et al., 2011) y también se ha asociado a una epidemia internacional de queratitis producida por *Fusarium* (López-Cerero et al., 2009).

Otro factor que también parece estar relacionado, es la coinfección con bacterias como *Pseudomona auruginosa* (Gorlin et al., 1996; Kelly and Xu, 1996; Dini et al., 2000; Sharma et al., 2013).

### **Diagnóstico**

El diagnóstico de esta enfermedad no es complicado siempre que el observador demuestre experiencia y habilidad, ya que los quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* son fácilmente observables en los raspados o biopsias de lesiones corneales, a partir de los cuales pueden también ser cultivadas. Sin embargo, en muchos casos como el diagnóstico se retrasa o no es el acertado, el pronóstico y evolución es malo.

### **Tratamiento**

El tratamiento es principalmente tópico, preferiblemente combinado diamidina + biguanida, e intensivo al principio, para lograr una rápida lisis de los trofozoítos y que el menor número posible de ellos revierta a formas quísticas, más resistentes. Las diamidinas disponibles son isetionato de propamidina al 0,1% y la hexamidina al 0,1% y las biguanidas, las más activas son la clorhexidina y la polihexametil biguanida ambas en colirio al 0,02%. PHMB (Lavado, 2012).

Últimamente se están llevando a cabo ensayos de tratamientos antiamebianos *in vitro* y el resultado es que la eficacia antiacanthamoeba, determinado por el grado de crecimiento y la tasa de incidencia de muertes, fue mayor para hexamidina y biguanida de polihexametileno que para digluconato de clorhexidina y voriconazol (Kowalski et al., 2013).

Otras alternativas por vía tópica son los aminoglucósidos (neomicina y paromomicina) y los imidazoles (miconazol y clotrimazol, ambos al 1 %), aunque de menor actividad frente a los quistes. En casos de inflamación persistente, puede ser útil la aplicación tópica de corticoides a dosis bajas. La administración de esteroides no obstante, ha provocado controversia ya que podría prolongar el ciclo de vida de los quistes resistentes y la proliferación (McClellan et al., 2001), por lo que se recomienda si se administran esteroides, realizarlo al mismo tiempo que los amebicidas. La transformación del trofozoíto en quiste, está demostrado que disminuye el efecto de los fármacos (Lloyd et al., 2001).

Para erradicar totalmente los quistes, hay por lo menos tres opciones disponibles: tratamiento con 3% de peróxido de hidrógeno de 6 a 24 h; 0,0015% poliaminopropil biguanida, que es eficaz contra trofozoítos y quistes en esta concentración después de 4 h de incubación, y 0,06% de povidona yodada durante 4 h. (Lorenzo-Morales et al., 2013a).

Otros estudios ponen de manifiesto que la fisiopatología de esta infección implica una compleja serie de eventos secuenciales que incluye la producción de varias proteasas patógenas que degradan la membrana basal e inducen la apoptosis y citolisis de los elementos celulares de la córnea, y termina provocando la disolución del estroma de la córnea colágeno. El seguimiento de estas proteasas podría conducir al desarrollo de vacunas que se dirigen hacia el proceso de la enfermedad en lugar de destruir al agente patógeno (Clarke et al., 2006; Tripathi et al., 2012).

Estudios anteriores han demostrado que los quistes de *Acanthamoeba* están parcialmente compuestos de celulosa (Neff y Neff, 1969; Potter & Weisman 1972, 1976).

La isomerasa de xilosa y celulosa sintasa son importantes mediadores del enquistamiento en *A. castellanii* por lo tanto se pone de manifiesto el

potencial del desarrollo de la tecnología acerca del silenciamiento de siRNA para el desarrollo de agentes amebicida para tratar las infecciones con eficacia (Aqeel et al., 2013).

*El método de Cross-linking (CXL) o de reticulación*, utilizando ultravioleta A (UV-A) y riboflavina es un tratamiento que fue desarrollado para aumentar la resistencia biomecánica de la córnea dándole así posibilidades para bloquear la progresión del queratocono. El procedimiento se basa en el uso de la riboflavina como un fotosensibilizador, que genera especies de oxígeno reactivas cuando son activados por la radiación UV-A en 365 o 370 nm. A modo de reacciones fotoquímicas, éstos dan lugar a enlaces covalentes o enlaces cruzados en el estroma corneal. La riboflavina tiene una estructura anular plana que se intercala entre las bases de ADN y ARN, que se traduce en la oxidación de ácidos nucleicos cuando se ilumina. La riboflavina induce un cambio en las propiedades del colágeno y tiene un efecto de refuerzo en el estroma de la córnea, la cual estabiliza y aumenta su resistencia a la degradación enzimática de bacterias evitando la progresión de la degradación de la córnea. Limitaciones de la aplicación de la radiación UV son principalmente la falta de penetración y una fuerte dependencia de la distancia desde la fuente de UV, que puede resultar en inactivación microbiana no homogénea.

Sin embargo, hasta el momento, los resultados de los estudios *in vitro* como el de Kashiwabuchi et al., en 2013, en las micosis y Del Buey et al., 2012, en la queratitis por *Acanthamoeba* no han demostrado ningún efecto (Kashiwabuchi et al., 2013; Del Buey et al., 2012).

Sin embargo, el metaanálisis realizado por Alio et al., 2013 de ensayos *in vivo*, a expensas de realizar ensayos controlados aleatorios, concluye que la evidencia disponible apoya el uso de CXL para el tratamiento de queratitis infecciosa y continúan realizando ensayos *in vivo* así como

tratamientos en casos clínicos con éxito en los resultados (Alio et al., 2013; Lavado Landeo, 2012; Arance-Gil et al., 2013).

El tratamiento quirúrgico, *la queratoplastia*, puede ser necesario en el caso de que la córnea esté lesionada de forma permanente o en los casos en los que la respuesta al tratamiento médico no haya sido buena.

Sin embargo, es muy importante la erradicación de la enfermedad antes del trasplante corneal, ya que se han reportado casos de recurrencia de la misma, una vez realizado el trasplante. Se han reportado mejores resultados en los casos en los que la intervención se realizó después de tres meses de inactividad de la queratitis.

### **3.4 Acanthamebiosis cutánea**

Las infecciones de la piel producidas por amebas, son raramente diagnosticadas. Están relacionadas con el estado inmunológico de manera que se diagnostican en personas inmunodeprimidas, aunque se han reportado casos en personas inmunocompetentes en Perú (Galarza et al., 2009).

#### **Manifestaciones clínicas y vía de penetración**

Las manifestaciones clínicas también dependen del estado de inmunocompetencia, de forma que los pacientes inmunocompetentes presentan múltiples lesiones en la piel, manifestándose de forma aguda, sin compromiso del sistema nervioso central y que evolucionan favorablemente con el tratamiento.

Sin embargo, los pacientes inmunodeprimidos (VIH+, los que se encuentran con tratamiento de quimioterapia) presentan lesiones cutáneas, que suelen tener una evolución de varios meses, además de tener afectación del SNC. En general se puede decir que se trata de una manifestación tardía de la diseminación de la acanthamebiosis sistémica.



Las lesiones cutáneas se caracterizan por ser papulonodulares, purulentas, aparecen pústulas, placas y celulitis, además de abscesos intramusculares. Fig 14.



Fig.14 Lesión cutánea ulcerativas necrotizantes de 3 meses de evolución por *Acanthamoeba* (Galarza et al., Dermatol. peru.v.16n.1Limaene./abr.2006)

### **Diagnóstico**

Tanto el cultivo de las lesiones como en la biopsia se observan trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba spp.*

Sólo en algunos casos los pacientes tenían antecedentes de baño en piscinas.

### **Tratamiento**

El tratamiento en el caso de los pacientes inmunocompetentes referido en el trabajo de Galarza et al, fue con itraconazol y anfotericina B, con una total recuperación. Sin embargo, en el caso de los pacientes con afectación del SNC, fallecieron por la afectación meníngea (Galarza et al., 2009).

## 4. INTERACCIÓN ENTRE AVL Y BACTERIAS PATÓGENAS

### 4.1. Bacterias resistentes a las amebas

La interacción de las amebas de vida libre con otros microorganismos, bacterias, virus, hongos, tiene importantes consecuencias en la microbiología y ecología medioambiental. El hecho de que las AVL tengan a las bacterias como base nutricional, supone el control ambiental de la densidad de dichos microorganismos ya que las bacterias son fagocitadas por las amebas y digeridas en los fagolisosomas (Ronn et al., 2002).

El estudio de la asociación entre AVL y bacterias patógenas comenzó con el objetivo de favorecer el desarrollo y crecimiento de AVL (en cultivos), utilizando éstos patógenos como nutrientes para los medios de cultivo, (Drozanski y Drozanska, 1961; Culbertson et al., 1965) desarrollando durante décadas las técnicas de estudio de la interrelación entre ambos microorganismos, hasta la actualidad. La principal conclusión es que, la combinación de técnicas microscópicas y moleculares son la forma más eficaz para obtener resultados fiables. También se destaca la necesidad de estandarizar las técnicas para poder realizar comparación de resultados ambientales y clínicos (Goñi et al., 2014). Destacamos entre ellas, la técnica de biología molecular denominada pentaplex-nested PCR, que permite identificar de forma simultánea, patógenos en el interior de las AVL como *Mycobacterium spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella spp*, *Vibrio cholerae* y cianobacterias tóxicas e interacciones entre ellas (Calvo et al., 2013).

Sin embargo, la interacción entre las amebas y las bacterias en algunos casos, se caracteriza por una simbiosis en la cual, ambos microorganismos se beneficia de la asociación y en otros casos por un

parasitismo, ya que terminan con la liberación de la bacteria y la lisis de la ameba. Estas bacterias son las denominadas “*Bacterias Resistentes a la Depredación de las Amebas*”.

Durante la fagocitosis, las amebas y macrófagos producen como metabolitos óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, que generan un ambiente tóxico que puede matar a las bacterias fagocitadas. Bacterias como *Mycobacterium spp.* desarrollan varias estrategias para resistir a este estrés oxidativo, incluyendo la expresión de catalasa/peroxidasa y superóxido dismutasa lo que le permite la supervivencia en las amebas y macrófagos (Bandyopadhyay et al., 2003).

Dentro de este grupo, se encuentran las que están en el interior de las amebas pero no se multiplican como algunas coliformes y *Mycobacterium* o micobacterias, las que se reproducen en el interior de ellas como *Vibrio cholerae* pero que no destruyen la célula y las que se multiplican y producen la lisis de la ameba como *Legionella* y *Listeria*.

En cualquier caso, las amebas realizan una función protectora de las bacterias frente a condiciones ambientales desfavorables. Estas condiciones desfavorables pueden ser cambios en las condiciones físicas del medio y el efecto de desinfectantes o drogas antibacterianas (Thomas et al., 2009; Moliner et al., 2010; Greub & Raoult, 2004; Ben Salah et al., 2009). Al mismo tiempo, actúan como vectores de transmisión dando lugar a lo que algunos autores han denominado como “**Trojan horse**” (caballo de Troya), que constituyen auténticos reservorios biológicos al permitir su multiplicación en el interior, y protegerse mediante el enquistamiento, hasta que las condiciones hayan variado y puedan liberarse en número suficiente para producir enfermedad, como sucede en el caso de *Legionella pneumophila* (Barker & Brown, 1994; Khan & Siddiqui, 2014).

Otros estudios han demostrado que el cocultivo e interacción de *Acanthamoeba castellani* con *Salmonella typhi* o *Campylobacter*, aumenta la supervivencia de las bacterias, y que por lo tanto, la ameba favorecería su persistencia ambiental y transmisión (Douesnard-Malo & Daigle, 2011; Axelsson-Olsson et al., 2005, 2010).

### ***Transferencia genética***

Diferentes estudios ha demostrado que las amebas de vida libre permiten la transferencia horizontal de genes con y entre los microorganismos que albergan. El ADN también puede ser transferido de los mismos protozoos a los microorganismos, como en los casos de la *A. polyphaga*, Mimivirus, *Legionella drancourtii* y *Chloroflexus aurantiacus*. La transferencia genética, también pueden ocurrir en la dirección inversa, de los microorganismos a los protozoos de vida libre, como en el caso de *Tetrahymena thermophila*, que adquirió genes bacterianos (Lamrabet et al., 2012).

## **4.2 Consecuencias para la salud pública**

Las bacterias que utilizan a las amebas como protección, y que tienen una mayor capacidad patógena para el ser humano son *L. pneumophila*, *E. coli* 0157, *Coxiella burnetii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium avium* (Greub & Raoult, 2004; Khan, 2008).

Las bacterias patógenas en relación a las AVL que han sido objeto de estudio, son las siguientes:

### **4.2.1 *Legionella pneumophila***

Este microorganismo debe su nombre a su identificación por primera vez durante un brote de neumonía en una convención de la Legión Americana en 1976.

Es un bacilo aerobio, gram negativo, no capsulado, móvil con uno o más flagelos polares o laterales, aunque ocasionalmente se han visto cepas inmóviles.

La infección se produce por la inhalación de aerosoles o microaspiración de agua contaminada.

Hoy en día, gracias a medios de cultivo como el BCYE o a las técnicas de PCR, recuperamos bacterias de la familia Legionellaceae en multitud de ecosistemas naturales como lagos, manantiales o tierra y artificiales como fuentes, spas o torres de refrigeración (Borrella et al., 2005). Excluyendo el medio marino, *Legionella* está presente en casi cualquier medio hídrico.

La legionelosis, es una infección de distribución mundial, con una incidencia anual estimada de 2-20 casos/100.000 habitantes. En España, en el 2012 la tasa de incidencia fue de 2,2 casos/100.000 hab. y en Aragón independientemente de los brotes, la incidencia de la legionelosis ha aumentado progresivamente. Probablemente, la mejor notificación de los casos y el empleo generalizado desde 2002 del diagnóstico mediante antígeno específico en orina influyen en este incremento. Sin embargo, en 2010 y 2011 se observa un descenso llamativo y aunque en el 2012 (3,1 casos/100000 hab.) se observa un discreto aumento respecto al 2011, estas cifras continúan siendo las más bajas de las observadas en la última década. (Departamento de Sanidad Bienestar Social y Familiar. Gobierno de Aragón, 2013)

Resulta sorprendente que un microorganismo tan ubicuo, no se aislara con anterioridad de muestras ambientales. Existen diferentes explicaciones como es la dificultad para la tinción, o que la enfermedad que produce es muy similar a otras neumonías de origen no bacteriano, o a la exigencia nutritiva del medio para su desarrollo. Sin embargo, en ocasiones son difíciles de cultivar, pero parece que se explica porque estos casos

corresponden a los LLAPs (Legionella-like amoebal pathogens o patógenos amebianos símil Legionella). Estos microorganismos son, posiblemente, nuevas especies del género *Legionella*, y ni siquiera crecen en los medios de cultivo enriquecidos, teniendo que hacerlo en cocultivo con protozoos (Fields, 2002) y en concreto son las amebas de vida libre, las que realizan la función de reservorio pero también contribuyen a la propagación y transmisión al ser humano, ya que según Rowbotham la contaminación no se produce por la inhalación de *Legionella* libre sino de células de amebas con *Legionella* en su interior (Greub & Raoult, 2004).

*Legionella*, cuando se encuentra infectando los quistes de *Acanthamoeba polyphaga*, se protege del efecto del cloro lo que contribuye a la dificultad de erradicar la contaminación de los sistemas de agua tratados con los métodos habituales, así como utilizar a la ameba como medio de dispersión y colonización de nuevos hábitats a través del aire (Barker & Brown, 1994).

Se ha demostrado en algunos ensayos, que la bacteria *L. pneumophila*, cuando procedía del crecimiento en el interior de la ameba, adquiriría una mayor resistencia frente a los biocidas, que aquellas bacterias del mismo género que crecían *in vitro*, lo que pone de manifiesto que se produce un cambio en el fenotipo de las bacterias intraamebas. Este hecho junto con la transferencia genética entre bacterias resistentes a las amebas y éstas mismas, sugiere la hipótesis, de que las amebas se convierten en un sistema de adaptación genética a la fagocitosis, que posteriormente es utilizado por las bacterias para infectar y colonizar macrófagos en el ser humano y animales.

La interacción entre protozoos y bacterias como *Legionella* spp., favorecen la proliferación de éstas en los sistemas de agua pero parece ser que es la existencia de amebas en el biofilms, la que confiere las condiciones

favorables para su proliferación y alimentación además de protegerlas del efecto de los antimicrobianos o biocidas (Barbeau & Buhler, 2001).

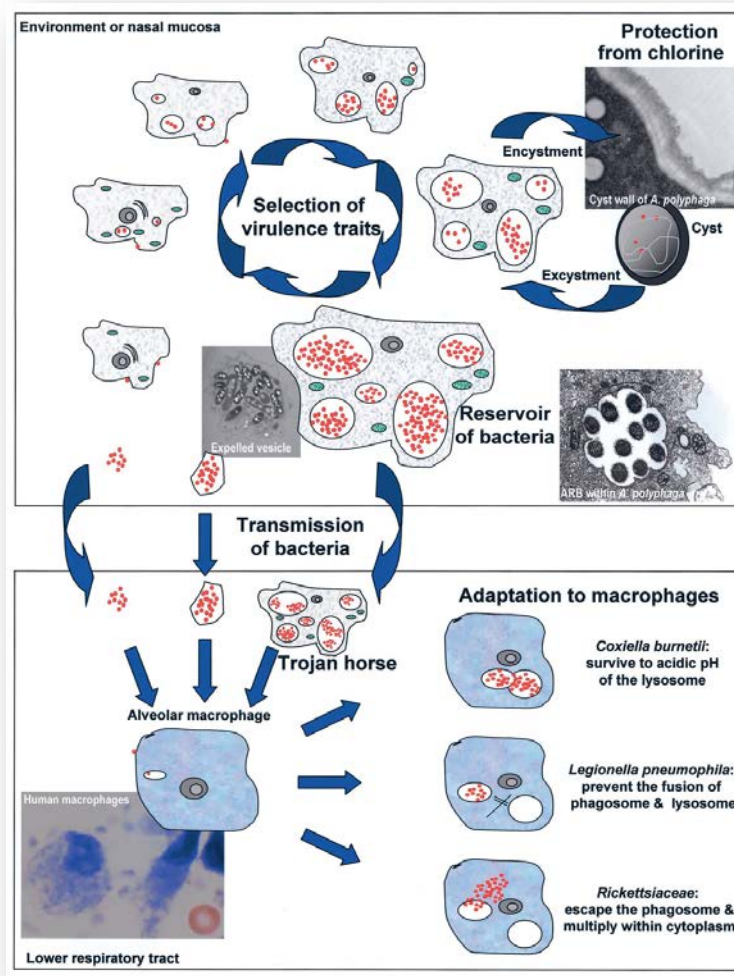


Fig.15 Comportamiento de las AVL como reservorio de bacterias patógenas. Trasmisión de las bacterias por las amebas al organismo hospedador. Desarrollo de las baterías intra-amebas de capacidad de resistencia a los macrófagos por adaptación genética.

Review Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae Greub and Raoult, 2004.

No se conoce muy bien cómo contribuyen estos protozoos al crecimiento y proliferación de *Legionella pneumophila* pero la presencia de *H. vermiformis* o *A. castellanii* en estos sistemas es necesaria para la replicación de *L. pneumophila*, que se encuentran en estado latente en el biofilm, pero no se multiplica (Murga et al., 2001; Declerck et al., 2007b)

### **4.2.2 *Mycobacterium* spp.**

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son un grupo de micobacterias distintas de *Mycobacterium tuberculosis* complejo (MTC, incluido *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium leprae*). Han sido identificadas como patógenos oportunistas en humanos que producen numerosas infecciones, tanto en personas inmunocompetentes como inmunodeprimidas, por lo que es un problema sanitario importante. Las manifestaciones más frecuentes son a nivel pulmonar, cutáneo y en los niños las linfadenopatías cervicales.

Han sido aisladas del suelo, del agua y suponen también un gran riesgo sanitario ya que también se han aislado de material quirúrgico, cuya contaminación procede de la presencia de estos organismos en los grifos de agua que junto con la resistencia a los desinfectantes utilizados comúnmente ha sido, en algún caso, la causa de los pseudo-brotes de infecciones asociadas con implantes quirúrgicos, y enfermedades pulmonares tras broncoscopia (Whiley et al., 2012).

El estudio de Thegerström et al., 2008 concluye, que existe un aumento en la incidencia de casos de infección por *Mycobacterium avium* en niños sanos en Suecia, con adenopatías cervicales principalmente, en aquellos que vivían próximos al agua (Thegerström et al., 2008).

Los quistes de *Acanthamoeba* pueden soportar temperaturas elevadas y concentraciones de cloro libre utilizado para la desinfección de



los sistemas de abastecimiento, lo que podría explicar que se recupere *Mycobacterium* del agua caliente sanitaria que está a 42°C, protegiéndose en el interior del quiste, cuando esta bacteria no se puede cultivar a esta temperatura (Adekámbi et al., 2006). Aunque no existe evidencia acumulada que indique que MAC (Complejo *Mycobacterium avium*) es capaz de residir en el agua potable dentro de la ameba de vida libre sí se ha replicado de forma experimental, dentro de la ameba *Acanthamoeba castellanii* (Cirillo, 1997), *Dictyostelium discoideum* (Skriwan et al., 2002) y *Acanthamoeba polyphaga* (Salah et al., 2009) que proporciona un nivel de protección a la bacteria (Whiley et al., 2012).

La interacción confiere también un aumento de la resistencia a algunos antibióticos como en el caso de *Mycobacterium avium* a la rifabutina y azitromicina lo que aumenta su virulencia.

### **4.2.3. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que se encuentra distribuida ampliamente en el medioambiente. A menudo es localizada en aguas naturales como ríos, lagos pero no así tan frecuentemente en el agua de red. Sin embargo, sí que ha sido aislada en los biofilms que se forman en los sistemas de distribución.

*P. aeruginosa* es el agente causal de enfermedades en el ser humano, principalmente en aquellos inmunocomprometidos, por lo que es un patógeno hospitalario que puede causar infecciones nosocomiales como endocarditis, neumonías, osteomielitis, infecciones del tracto urinario, gastrointestinales, meningitis y es a menudo causante de bacteriemias.

En relación a las aguas recreativas, donde también ha sido aislada, es la principal causante de foliculitis, infecciones de oído y de queratitis en pacientes portadores de lentes de contacto.

El crecimiento y desarrollo de esta bacteria se ve favorecido por las altas temperaturas del agua, por lo que las piscinas climatizadas y spas suponen un reservorio para la transmisión de estos patógenos favorecido, por los niveles de cloro bajos.

La vía de transmisión principal al ser humano son la piel o mucosas en caso de contacto con agua contaminada o por vía respiratoria a través de aerosoles (Mena & Gerba, 2009).

Existen en el medioambiente *Pseudomonas* spp. capaces de resistir la fagocitosis de las AVL (que son en principio sus depredadores ambientales), por la producción de proteínas efectoras, que son capaces de destruir las amebas, como es el caso de la *Acanthamoeba castellani* (Abd et al., 2008).

*P. aeruginosa* es la bacteria que mayor capacidad demuestra para contaminar y adherirse a la lente de contacto formando biofilms, y favorece también la adsorción de *Acanthamoeba* por lo que se considera el principal agente causal, junto con *A. polyphaga* de queratitis infecciosa asociada a lentes de contacto (Simmons et al., 1998; Dutta et al., 2012).

#### **4.2.4 Cianobacterias tóxicas**

Las cianobacterias o cianofíceas (algas azules) son microorganismos procariotas, aeróbicos y fotoautótrofos. Su facilidad de crecimiento favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, la concentración de nutrientes como nitrógeno y fósforo favorecen su desarrollo.

El aumento de la eutrofización de los medios acuáticos, ha favorecido la proliferación de “blooms” (floración) lo que altera la calidad del agua y además se conoce la capacidad toxigénica de estos microorganismos. Aproximadamente el 50% de los blooms son tóxicos.

Las toxinas que producen algunas cepas de ciertas especies de cianobacterias como *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*,

*Cylindrospermopsis*, tienen potente capacidad tóxica a nivel neurológico y hepático para el hombre y animales.

Las neurotoxinas producen la muerte en pocos minutos desde la exposición y las hepatotoxinas, que son el tipo más común de intoxicación producido por las cianobacterias, tienen una evolución más lenta, horas e incluso días. Además, hepatotoxinas como microcistina y nodularias, han resultado ser potentes promotores de tumores hepáticos a pequeñas dosis en exposiciones prolongadas, por lo que el agua de red precisa de control y seguimiento por la posibilidad del aumento de cáncer de hígado en las poblaciones expuestas.

En la mayoría de los países europeos, los organismos responsables del abastecimiento de agua potable, han incluido planes de vigilancia y control de cianobacterias y sus toxinas. En España no existe ninguna regulación al respecto y aunque los episodios científicamente documentados son pocos, se han confirmado blooms de cianobacterias tóxicas en embalses de abastecimiento público (Roset et al., 2001).

En el Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX se vienen realizando desde 1970 diferentes tipos de estudios que muestran la abundancia y distribución de cianobacterias en los embalses españoles. Hace unos años se inició una nueva línea sobre la toxicidad y toxinas producidas por estas cianobacterias en embalses destinados a actividades recreativas y para la producción de aguas de consumo (Quesada et al., 2004). Estos estudios realizados en 171 embalses de las cuencas del Guadalquivir, Guadiana, Tajo y Duero, indican que aproximadamente en la mitad de los embalses estudiados, las cianobacterias potencialmente tóxicas son abundantes o dominantes y presentaron toxicidad debida a microcistinas, anatoxinas o cilindrospermopsina y recientemente se ha detectado por

primera vez la cianotoxina PSC (paralytic shellfish poisoning)( Wörmer et al., 2011).

En un estudio realizado en embalses de la cuenca del Ebro, se detectó *Mycrocystis* en el interior de una AVL (García et al., 2013). El escaso número de resultados positivos de *Mycrocystis* asociado a AVL, puede deberse a las conclusiones del estudio de Urrutia–Cordero et al., 2013, el cual muestra la importancia de la toxicidad de cianobacterias frente a las amebas de vida libre, debido a que las cianobacterias pueden contener una gran variedad de compuestos químicos capaces de afectar negativamente la vida libre de amebas y herbívoros (Urrutia-Cordero et al., 2013).

Por el riesgo que supone la presencia de estas cianotoxinas en el agua destinada al consumo animal y humano, se están llevando a cabo estudios sobre procesos de inactivación en las plantas de tratamiento de agua potable, y parece ser que la utilización de múltiples barreras auxiliares han tenido buenos resultados (Westrick et al., 2010). También resulta interesante la relación entre AVL y Cianobacterias tóxicas, dada la capacidad que se ha demostrado en las amebas como trasmisoras y reservorios de otros microorganismos (García et al., 2013; Calvo et al., 2013).

## **5. CRYPTOSPORIDIUM SP. Y GIARDIA DUODENALIS**

### **5.1 *Giardia* spp.**

#### **Ciclo biológico y epidemiología de *Giardia duodenalis***

*Giardia* sp. y *Cryptosporidium* spp. son protozoos intestinales de transmisión feco-oral.

Los quistes son la forma resistente del parásito y responsables de la transmisión de la giardiosis. Los quistes son muy resistentes y pueden sobrevivir hasta varios meses. La infección puede ocurrir con un número muy bajo de quistes (Rendtorff et al., 1954).

La infección se trasmite de forma directa por ingestión de quistes en el agua y alimentos contaminados, o por la vía feco-oral (Bertrand & Schwartzbrod, 2007). La contaminación por agua tanto de consumo como de aguas recreativas ha sido documentada (Abd El-Salam, 2012). También se han producido casos de giardiosis por consumo de alimentos contaminados.

La prevalencia de la giardiosis en la población está relacionada con la existencia y estado de las infraestructuras sanitarias así como con los hábitos higiénicos. En países en vías de desarrollo, *G. duodenalis* afecta entre un 20 y 30% de la población, siendo los niños menores de 5 años los más afectados debido a sus hábitos gregarios. En los países desarrollados, el parásito es frecuente en guarderías. Sin embargo, se han comunicado casos también en nadadores, campistas, homosexuales, viajeros internacionales a áreas endémicas y personas que viven en condiciones de hacinamiento. Este parásito es además la principal causa de brotes de transmisión hídrica en estos países.

Experimentalmente se ha desarrollado la infección con la ingestión de 10 quistes del parásito, pero diferentes autores refieren que uno sólo es suficiente para desencadenar el proceso infeccioso (Cañete et al., 2004).

Las técnicas de biología molecular han permitido poner de manifiesto la diversidad genética de *Giardia duodenalis*, habiéndose diferenciado 7 genotipos que se denominan A, B, C, D, E, F y G. Estos genotipos tienen una especificidad de hospedador. En humanos se han identificado el genotipo E, C o G, característicos del ganado, perros y gatos pero los que tienen mayor implicación en el ser humano son el A y B (Thompson et al., 2000).

El genotipo B es más frecuente en algunas comunidades como Zaragoza y si tenemos en cuenta que algunos estudios asocian una mayor prevalencia de casos asintomáticos a este grupo B, esto favorecería la persistencia de la infección en la comunidad (Goñi et al., 2010).



Fig. 16 Trofozoíto *Giardia*

[http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis_il.htm)

### **5.2 *Cryptosporidium* spp**

La criptosporidiosis es una zoonosis de transmisión feco-oral, de amplia distribución mundial, causada por diversas especies de *Cryptosporidium*. Las especies que causan el 90% de criptosporidiosis en humanos en el mundo son *C. parvum* y *C. hominis* (Tosini et al., 2010). La transmisión a través del

agua es posible debido a la resistencia de los ooquistes al cloro, que es la forma infectante.

La manifestación clínica más importante es la diarrea en humanos y animales, lo que puede llevar a deshidratación y desequilibrio electrolítico, sobretodo en niños y pacientes inmunodeprimidos.

No existe hasta el momento un tratamiento efectivo para la cryptosporidiosis, aunque se están realizando algunos ensayos para el tratamiento con antibióticos que podría resultar efectivo. En algunos casos puede remitir espontáneamente, o producirse reinfecciones y cronificarse el cuadro clínico, por lo que hay que atender principalmente al desequilibrio hidroelectrolítico. La contaminación del agua por el ganado en cuencas de ríos en España, es un riesgo para la salud pública por lo que es necesario controlar el agua en las fuentes de agua utilizadas para fines recreativos y en los cursos de agua artificiales utilizados por los agricultores: canales de agua, agua de bebida para animales y sistemas de drenaje (Navarro-i-Martinez et al., 2011).

En un estudio cuyo objetivo era evaluar la presencia de *Cryptosporidium* en la zona centro de España, resultó que las muestras procedentes de plantas de tratamiento de agua potable para el consumo humano resultó negativo lo que indica que para este parámetro, son adecuadas para el uso público, mientras que en plantas de tratamiento de agua residual y playas recreativas de agua dulce, obtuvieron resultados positivos para este protozoo (Galván et al., 2014).

Estudios epidemiológicos realizados en EEUU durante el año 2009-10 para identificar los agentes causales de brotes epidémicos relacionados con agua recreativa, identificaron a *Cryptosporidium* spp. como agente causal en el 42% de los casos registrados, todos ellos usuarios de establecimientos de aguas recreativas tratadas (Hlavsa et al., 2014). En estudios de revisión

posteriores se ha observado, un aumento de casos reportados de cryptosporidiosis en usuarios de aguas recreativas, pero según el autor puede ser debido al aumento en el registro y declaraciones de los casos así como la investigación del origen de los mismos (Chalmers, 2012).



## 6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

### EL AGUA COMO RESERVORIO DE AVL Y OTROS MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

#### 6.1 Marco conceptual

En el agua y en el medio ambiente siempre hay microorganismos presentes, y de los miles de familias y variedades de ellos, la gran mayoría no son nocivos para el hombre y los seres vivos, inclusive convivimos con ellos y son parte de los procesos de la vida. No obstante, algunos de ellos y solo unos cuantos, son nocivos para el hombre y seres vivos, pudiendo causar morbilidad e incluso la muerte.

Los agentes infecciosos pueden ser transmitidos al hombre y seres vivos por vehículos como aire y alimentos, pero el más común es el agua que se consume como agua de beber.

Durante siglos y antes de los mayores descubrimientos en microbiología, especialmente los realizados por Kock y Pasteur, debido a que se desconocían las causas y por las pésimas condiciones de higiene, las plagas infecciosas arrasaban con poblaciones enteras en Europa.

Una vez demostrado que los microorganismos son la causa de terribles enfermedades que causaban tantas muertes, se buscó la manera de evitar o disminuir la incidencia de contaminación de las aguas potables y sus fuentes, dando inicio a la ciencia de la higiene ([www.oocities.org/edrochac/sanitaria/desinfeccio](http://www.oocities.org/edrochac/sanitaria/desinfeccio)).

Uno de los primeros tratamientos implementados para tratar de evitar las enfermedades infecciosas transmitidas por el agua fueron la sedimentación y filtración, que disminuyen la carga microbiana pero no garantizan la desinfección total.

En 1850 John Snow después de un ataque de cólera en Londres, implementó un sistema de desinfección por cloro para una fuente de abastecimiento en esta ciudad.

Sims Woodhead, en 1897, con los antecedentes de Snow y tratando de dar alivio a una epidemia de tifoidea en Kent Inglaterra, también empleó cloro líquido para aliviar los estragos de la enfermedad.

Los éxitos de estas experiencias hicieron que en Inglaterra se empleara la cloración como una medida preventiva de contaminación microbiológica del agua y posteriormente en 1908 en New Jersey en Estados Unidos, se implementó la cloración como un proceso de tratamiento en la potabilización del agua, y se hizo evidente la disminución de incidencia de enfermedades infecciosas en los consumidores. En años posteriores se generalizó la desinfección del agua con cloro y sus derivados en todo el país y finalmente en todo el mundo.

Como se ha expuesto a lo largo de los capítulos anteriores, es creciente la evidencia científica que identifica la presencia de AVL en el agua de red incluso en la destinada al consumo humano y ha sido demostrado que las AVL son patógenos oportunistas y además transmisores de otros microorganismos como bacterias, virus, hongos al ser humano y a los animales, lo que supone un riesgo sanitario que todavía se está evaluando (Thomas & Ashbolt, 2011).

Estudios realizados en España en plantas potabilizadoras y plantas de tratamiento de aguas residuales para su reutilización en regadíos, o su emisión de nuevo a los ríos, se han aislado AVL patógenas como *Acanthamoeba* T4 y T3, *Hartmannella vermiformis* y *Naegleria spp* principalmente (García et al., 2011; García et al., 2013). En otras zonas de España, fueron aisladas tanto en los puntos de entrada a las plantas depuradoras, como en los de salida y al estudiar el genotipo se observó que

perteneían a genotipos distintos. Estos hechos ponen en evidencia dos supuestos: primero, que el tratamiento que se realiza tanto en las plantas potabilizadoras como de aguas residuales no consiguen la eliminación de estos microorganismos y segundo que además, es posible que se incorporen a los puntos de emisión, amebas de los biofilms del cuerpo de las plantas de tratamiento y de esta forma terminen en la red de abastecimiento público (Magnet et al., 2013).

El control actual que se exige tanto del agua potable como del agua de recreo, se basa en la detección de microorganismos fecales, algunos protozoos como *Cryptosporidium* spp y bacterias (*Legionella*, *Pseudomonas*) pero no de amebas de vida libre. En los estudios realizados recientemente, se aconseja que se incluya en los protocolos de control la detección e identificación de estos microorganismos.

En España se ha estudiado la prevalencia de estos microorganismos en pantanos (García et al., 2013) plantas de tratamiento de agua, plantas de tratamientos de aguas residuales (García et al., 2011; Magnet et al., 2013), agua de mar y también del suelo e incluso en animales, (Lorenzo-Morales et al., 2007, 2005a; 2005b) en cuerpos de agua de piscinas existen estudios en Galicia, Madrid, pero no ha sido publicado recientemente ningún estudio del agua de la red pública en general y de fuentes y piscinas o aguas recreativas específicamente.



Fig.17 Vías de exposición. Riesgos para la salud asociados al agua. Plan Nacional de Salud y medio ambiente. Informe aguas y salud pública. 2007

## 7. MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL

A partir de 1984, coincidiendo con el incremento del número de portadores de lentes de contacto, la incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* aumentó de forma espectacular.

En la actualidad, la incidencia parece haberse estabilizado, probablemente porque los factores de riesgo entre los usuarios de estas lentes se han identificado y evitado. Aún así, más del 90% de los casos que se observan podrían evitarse utilizando un sistema eficaz de desinfección, como el calor o el peróxido de hidrógeno, el empleo de soluciones comerciales de suero fisiológico y la regular desinfección y limpieza del estuche de las lentes de contacto (Pérez-Irezábal et al., 2006), así como la precaución de protegerse los ojos con gafas al utilizar las piscinas y no utilizar las lentes en estos casos (Lorenzo-Morales et al., 2013) ya que hay documentados casos de pacientes usuarios de lentes de contacto que desarrollaron queratitis con antecedentes de baños frecuentes en piscinas (Arance-Gil et al., 2013).

En cuanto a la prevención de PAM, tenemos en cuenta que *Naegleria fowleri*, es una ameba termófila, es decir se desarrolla en aguas a temperaturas por encima de los 30°C. El hecho de que el calentamiento global afecta a la temperatura del agua, puede suponer que en un futuro aumenten los casos de PAM en aquellas zonas donde antes no habían sido reportados casos por sus características ambientales. Como medidas de precaución y ya que esta ameba es sensible a la cloración, las autoridades sanitarias deben intensificar la vigilancia en piscinas sobre todo en los meses de verano, y reducir la materia orgánica en éstas, ya que favorecen la proliferación de las amebas.

La vigilancia debe ser extensible a aquellos lugares como por ejemplo las fuentes ornamentales de las ciudades, donde los niveles de cloración y control microbiológico no son tan exigentes como en las piscinas, ya que su fin no es el baño pero que sin embargo, son utilizadas para esto, en épocas en las que la temperatura ambiental es elevada.

En general, la prevención se basaría en la vigilancia y control de piscinas, spas, hidromasajes, fuentes ornamentales, para la detección de amebas de vida libre patógenas por parte de las autoridades sanitarias, así como aumentar e intensificar las medidas higiénicas de estos recintos, tanto de los usuarios como técnicas correctas de control de la temperatura y cloración y en los casos de individuos inmunocomprometidos el conocimiento de la existencia del riesgo y por lo tanto la necesidad de extremar las precauciones.

### **7.1 Normativa sobre el control y análisis del agua de piscinas y fuentes ornamentales.**

Las piscinas constituyen uno de los servicios públicos en los que más atención deben poner los servicios de Salud Pública, ya que los elementos que se conjugan suponen un riesgo potencial para la salud de la comunidad, riesgo cada día más acentuado por el uso multitudinario que se hace de este tipo de instalaciones.

Indudablemente el aspecto más importante a controlar dentro de la vigilancia epidemiológica de estas zonas recreativas, es la calidad fisicoquímica y microbiológica de sus aguas, ya que la primera condición que debe cumplir un agua de piscina es la de pureza microbiológica, esto es, estar exenta de microorganismos patógenos capaces de alterar la salud de los bañistas. Asimismo, han de controlarse aquellos parámetros fisicoquímicos que puedan dar lugar a cualquier tipo de trastorno o molestia.

Si tenemos en cuenta que su uso está sometido a una demanda creciente por parte de la población, no sólo como lugares recreativos, sino también para la práctica del deporte y para el tratamiento de ciertas patologías, está suficientemente justificada la necesidad de llevar un control riguroso de la calidad de sus aguas.

El Artículo 16 de la normativa del Gobierno de Aragón sobre el control y análisis de agua de piscinas y fuentes ornamentales (“Boletín Oficial de Aragón”. Zaragoza, a 5 de julio de 2005; Actualizado 2013), exige en el agua de los vasos las siguientes características microbiológicas:

Parámetros	Parámetros
Valor límite	Valor límite
Bacterias aerob. totales a 37°C .U.F.C./ml 200	Coliformes totales/100 ml. 10
<i>Coliformes fecales/100 ml</i> Ausencia	<i>Estreptococos fecales/100 ml.</i> <i>Streptococcus faecalis</i> 10
<i>Staphylococcus aureus/100 ml</i> Ausencia	<i>Pseudomonas aeruginosa/100ml.</i> Ausencia
<i>Salmonella sp./100 ml.</i> Ausencia	Otros microorganismos. y parásitos patógenos/l Ausencia

Tabla 1. Valores exigidos en la calidad microbiológica del agua de piscinas y fuentes ornamentales

Sin embargo, la normativa vigente (octubre 2013), aunque se reconoce el riesgo, sólo obliga el control bacteriológico, así como la carga parasitológica únicamente de algunos parásitos patógenos, de manera que protozoos patógenos como las Amebas de Vida Libre, *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* y que son un riesgo importante para la salud de personas con factores de riesgo, queden sin detectar y controlar.

### **7.1.1 Mantenimiento de bañeras y piscinas de hidromasaje de uso colectivo**

Las bañeras o piscinas de hidromasaje son estructuras artificiales que contienen agua y están diseñadas para dirigir hacia el cuerpo humano agua mezclada con aire o agua a presión.

Independientemente del tipo de bañera o piscina de hidromasaje antes de su puesta en funcionamiento inicial se procederá a su limpieza y desinfección con 100 mg/l de cloro durante 3 horas o 15 mg/l de cloro durante 24 horas. En caso de bañeras que dispongan de sistema de recirculación, se pondrá en funcionamiento este sistema, durante 10 minutos como mínimo, para hacer llegar el agua a todos los elementos del sistema.

Los niveles de desinfectante residual serán los siguientes (“Boletín Oficial de Aragón”. Zaragoza, a 5 de julio de 2005; Actualizado en 2013; actualizado 2014):

- a) Cloro residual libre: Entre 0,8 y 2 mg/l.
- b) Bromo residual libre entre 2 y 4 mg/l (recomendado en agua templada) con pH mantenido entre 7,2 y 7,8.

Se realizarán al menos dos controles diarios de nivel de desinfectante y pH, cuyos resultados deberán ser anotados en el registro de mantenimiento.

### **7.1.2 Medidas preventivas en fuentes ornamentales**

Recogido en la normativa de la Comunidad de Aragón en su artículo 6. “Boletín Oficial de Aragón” Decreto julio de 2005 (Actualizado 2013, 2014). Se hace referencia a este Decreto ya que el análisis fue realizado tomando como referencia esta normativa.



Las fuentes ornamentales que puedan realizar descargas directas de bioaerosoles a zonas públicas, independientemente de todas las medidas preventivas que contempla la normativa básica estatal para este tipo de instalaciones, se limpiarán y desinfectarán con una periodicidad mínima semestral; cuando se ponga en marcha la instalación por primera vez; tras una parada superior a un mes; tras una reparación o modificación estructural, cuando una revisión general así lo aconseje y cuando así lo determine la autoridad sanitaria.

Si estas fuentes tienen instalado un circuito de retorno, estarán provistas de un sistema automático de cloración, capaz de mantener una concentración de cloro residual libre, que no será inferior en ningún caso a 1,5 (mg/l).

En este tipo de fuentes se revisará la calidad microbiológica del agua determinando el recuento total de aerobios, *Legionella* y protozoos (AVL) en el agua de la fuente con una periodicidad anual coincidiendo con la temporada estival.

## **II. OBJETIVOS**

## II. OBJETIVOS

---

### Objetivo general

El objetivo general de este estudio, fue identificar las AVL que circulan en el agua de red de la provincia de Zaragoza, determinando su prevalencia, géneros y genotipos, en aguas de consumo humano, fuentes ornamentales y aguas recreativas, y prestando una mayor atención sobre aquellas consideradas por la evidencia científica hasta el momento, como patógenas para el ser humano y los animales, así como su interacción con otros microorganismos.

### Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar molecularmente los principales géneros de AVL potencialmente patógenas en agua de red: fuentes ornamentales, agua particular y aguas recreativas de la ciudad de Zaragoza.
- Estimar la frecuencia y proporción de las AVL potencialmente patógenas y establecer la relación con factores físico químicos del agua de las piscinas estudiadas.
- Investigar el desarrollo de factores de virulencia de los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* aisladas, valorando la osmotolerancia y termotolerancia, así como la patogenicidad

“*in vivo*” de una cepa procedente de una piscina y una muestra clínica.

- Identificar molecularmente bacterias resistentes a las amebas de los géneros *Legionella spp*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* y cianobacterias tóxicas en el interior de las Amebas de Vida Libre aisladas en el agua.
- Aislar y caracterizar molecularmente amebas patógenas, en muestras clínicas procedentes de pacientes con queratitis.
- Investigar la presencia de otros protozoos como *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium sp.* mediante técnicas moleculares en el agua de piscinas municipales.
- Evaluar la posible asociación entre las amebas aisladas en aguas de red, en piscinas y en muestras clínicas, como vía de estimación cualitativa del riesgo para la Salud Pública y por lo tanto la necesidad de la implantación de medidas preventivas frente a infecciones producidas por AVL.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE**

Para el estudio e identificación de las Amebas de Vida Libre (AVL), se utilizaron muestras de agua de distintos reservorios dividiéndolo en tres partes, diferenciadas por la procedencia de las muestras analizadas:

- A.-En la primera parte, las muestras de agua corresponden a agua de red procedentes de fuentes ornamentales, aguas de consumo de domicilios particulares, aljibes, fuentes, torres de refrigeración o agua caliente sanitaria.
- B.-En la segunda parte, las muestras también eran de aguas de red, pero de uso recreativo ya que procedían de piscinas municipales cubiertas y descubiertas (al aire libre) y spas.
- C. Se incluyó una pequeña proporción de muestras de origen clínico, con el objeto de establecer comparaciones con las amebas procedentes de muestras de aguas de red.

## 1. MUESTRAS DE AGUA

### 1.1 CONDICIONES DE LA TOMA DE LAS MUESTRAS

#### **A.-Muestras procedentes de agua de red para consumo, uso doméstico o industrial**

En este grupo se incluyeron las muestras de: fuentes ornamentales, fuentes de consumo público, puntos superficiales, agua caliente sanitaria, torres de refrigeración y playas de zonas recreativas, distribuidas a lo largo de toda la ciudad de Zaragoza, y en ella la nueva zona construida con motivo de la Exposición Universal de 2008 en Ranillas (margen izquierda de la ciudad) Fig 1. El muestreo fue realizado por el personal técnico del Instituto Municipal de Salud Pública (IMSP), perteneciente al Ayuntamiento de Zaragoza, como parte de los análisis sistemáticos a que son sometidas estas instalaciones para control de *Legionella*, de los mismos puntos de muestreo para el control de legionelosis. El agua fue procesada y una gota se sembró en placas de agar no-nutritivo (ANN) con *E. coli* (ATCC 25922), en la sede del citado Instituto y tras su incubación durante al menos 15 días fueron remitidas al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Todas las placas fueron revisadas, clasificándolas como positivas o negativas morfológicamente siguiendo las claves de Page (1988) y aquellas en las que no se observó presencia de hongos, que pudieran interferir, fueron procesadas para su genotipado y estudio en mayor profundidad.

Las muestras de agua de consumo de los domicilios particulares, fueron tomadas por una parte, igual que en el caso anterior, por el muestreo realizado por el IMSP como control sanitario en casos en que se sospecha o es necesario controlar la presencia de *Legionella* y por otra parte, de forma puntual dentro de la Comunidad Autónoma de Aragón, tanto de la ciudad de Zaragoza como de pueblos de la provincia de Zaragoza

y Huesca, que fueron aportadas de forma voluntaria por sus propietarios o vecinos del pueblo en el caso de fuentes públicas.



Fig.1 Localización en Zaragoza capital, de algunos puntos de muestreo de agua por el MSP.

Las condiciones de la toma de muestras, para el estudio de AVL por el Instituto municipal de Salud Pública, siguen la disposición publicada en el REAL DECRETO 104/2003 de 4 de julio, (actualizado en el 2013) por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis ([www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon](http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon)).

Las medidas contenidas en este Real Decreto, son de aplicación en las instalaciones que utilicen agua en su funcionamiento, produzcan aerosoles y se encuentren ubicadas en el interior o exterior de edificios de



uso colectivo, instalaciones industriales o medios de transporte que puedan ser susceptibles de convertirse en focos para la propagación de la enfermedad. A continuación se detalla el protocolo de toma de muestra:

### **Condiciones y requisitos de la toma de muestras**

a) En depósitos de agua caliente y fría (acumuladores, calentadores, calderas, tanques, cisternas, aljibes, pozos etc.), se toma un litro de agua de cada uno, preferiblemente de la parte baja del depósito, recogiendo, si existieran, materiales sedimentados. Medir temperatura del agua y cantidad de cloro libre y anotar.

b) En la red de agua fría y caliente se toman muestras de agua de los puntos terminales de la red ( duchas, grifos, lavamanos) preferiblemente de habitaciones relacionadas con enfermos, así como de algún servicio común, intentando elegir habitaciones no utilizadas en los días previos a la toma. En la red de agua caliente se deberán tomar muestras de la salida más cercana y de la más lejana al depósito, de la salida más cercana al punto de retorno y de otros puntos terminales considerados de interés. Se tomará un litro de agua, recogiendo primero una pequeña cantidad (unos 100 ml) para después rascar el grifo o ducha con una torunda que se incorporará en el mismo envase y recoger el resto de agua (hasta aproximadamente un litro) arrastrando los restos del rascado. Medir temperatura del agua y cantidad de cloro libre.

c) En torres de refrigeración, condensadores evaporativos u otros aparatos de refrigeración que utilicen agua en su funcionamiento y generen aerosoles, se tomará un litro de agua del depósito (en el punto más alejado del aporte) y del retorno. Recoger posibles restos de suciedad e incrustaciones. Medir la temperatura del agua y la cantidad de cloro libre.

Dependiendo del estudio epidemiológico, se tomarán muestras de otras instalaciones como piscinas, pozos, sistemas de riego, fuentes,

instalaciones termales, así como de otros equipos que aerosolicen agua, como nebulizadores, humidificadores o equipos de terapia personal.

En estos supuestos el número de puntos de los que se recogen muestras de agua dependerá del tipo de instalación y su accesibilidad, y el volumen de agua a tomar dependerá de la cantidad de agua utilizada en su funcionamiento.

Fuentes	Aljibes	Playas de recreo	Agua de red	Agua de red particular	Torres de refrigeración	Puntos superficiales	ACS	total
449 <sup>1</sup>	15 <sup>2</sup>	35 <sup>2</sup>	37 <sup>2</sup>	330 <sup>3*</sup>	25 <sup>3</sup>	23 <sup>2</sup>	384 <sup>3</sup>	1298

Tabla 1. Origen de los puntos de muestreo y número de muestras. ACS: Agua caliente sanitaria

\*en este grupo están incluidas las muestras procedentes de domicilios particulares de colaboración voluntaria.

**1:** Control rutinario establecido por protocolo, de las fuentes ornamentales de toda la ciudad (control de legionelosis). Se refuerza la vigilancia en ciertas épocas del año.

**2:** Se procede diariamente a tomar muestras de agua de aproximadamente 10 puntos. Los puntos de muestreo deben ser representativos de toda la red. Se priorizan las zonas y se refuerza la vigilancia sanitaria en función de su riesgo para la salud.

**3:** No se recogen de forma rutinaria, se toman muestras de forma puntual, si se detecta o comunica algún riesgo de legionelosis.

## **B.-Muestras procedentes de aguas recreativas**

A efectos de este real decreto se establecen las siguientes definiciones:

*Piscina*: Instalación formada por un vaso o un conjunto de vasos destinados al baño, al uso recreativo, entrenamiento deportivo o terapéutico, así como las construcciones complementarias y servicios necesarios para garantizar su funcionamiento. Pueden ser descubiertas, cubiertas o mixtas.

*Vaso*: Estructura constructiva que contiene el agua destinada al baño, al uso recreativo o entrenamiento.

Los centros deportivos con **piscinas cubiertas o al aire libre**, se encuentran ubicados en el casco urbano de Zaragoza capital, y están distribuidos como se indica en la Fig 2.

Las instalaciones son utilizadas para diferentes actividades organizadas por la Concejalía de Deportes del Ayuntamiento de Zaragoza y también, para uso de la práctica libre de la natación. Por ello, fue necesaria la recogida de permiso escrito de dicha Concejalía, habiéndose firmado un Convenio por escrito para la colaboración en esta parte del estudio entre la Concejalía de Deportes del Ayuntamiento de Zaragoza, El Instituto Municipal de Salud Pública y el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, como gestor del Proyecto FIS (exp 549053/12; 1 junio 2012), que financia esta investigación.



Fig 2. Ubicación de los centros deportivos municipales con piscinas cubiertas y al aire libre estudiados en Zaragoza.

Los vasos correspondientes a las instalaciones cubiertas, se clasifican en: enseñanza, recreativo, competición, vaso climatizado (hidromasaje y jacuzzi) en este caso, las propiedades del agua no son curativas o medicinales, aunque sí tienen un efecto relajante. Las categorías en las que se clasifican los vasos, se relacionan con el tipo de actividad que se desarrolla en ellos.

Las categorías en las que se clasifican los vasos, se relacionan con el tamaño del mismo, por lo que los vasos correspondientes a las instalaciones descubiertas o al aire libre, se clasifican en: grande, mediana, pequeña y de chapoteo.

Igual que en el caso anterior, la toma de las muestras se llevó a cabo, por el equipo técnico del Instituto Municipal de Salud Pública, responsable del control sanitario de dichas instalaciones, y por personal investigador del laboratorio de la Facultad de Medicina.

Los centros municipales *de piscinas cubiertas* estudiados fueron 6. El número total de vasos en dichas instalaciones fue de 20, aunque el total de muestras obtenidas fue 60, ya que de cada vaso se tomaron tres muestras en diferentes localizaciones, en el caso del estudio de protozoos (Init et al., 2010). En todas las instalaciones se realizó un estudio bacteriológico del agua, para el que se tomó una única muestra ya que no existe evidencia que demuestre la diferencia de resultados según el lugar de la toma.

Los centros municipales con *piscinas descubiertas o al aire libre* estudiados, fueron 10, el número de vasos analizados 29 y las muestras obtenidas fueron 79. Para el control microbiológico, igual que en el caso de las instalaciones cubiertas, se tomó una única muestra de 1l. de cada vaso.

### Condiciones de la toma de las muestras

Las muestras de aguas para el estudio de amebas de vida libre, se recogieron de cada vaso, en frasco estéril de 1l. de capacidad. Se definieron tres puntos de muestreo: en la orilla, a 30cm. de profundidad y el biofilm que se forma en estas instalaciones (Init et al., 2010).

La muestra en la orilla o superficie (fig. 3) se toma desplazando el frasco sobre ésta, y llenándolo a modo de barrido, y la de profundidad, introduciendo el frasco hacia abajo vertical y a una profundidad de 30 cm., invirtiendo el frasco hasta que se complete el llenado y retirándolo hacia la superficie verticalmente, según indicaciones de los técnicos.

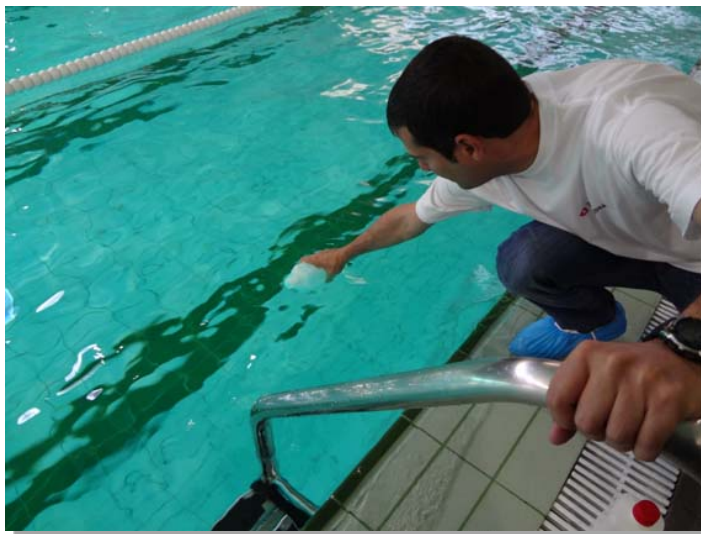


Fig. 3. Toma de la muestra de superficie.

La tercera muestra se toma con hisopo estéril, de la pared del vaso con objeto de aislar parásitos del biofilm que con frecuencia se forma en las paredes (Declerck et al., 2007; Donland et al., 2005; Lau & Ashbolt, 2009). Las tomas se realizan en un lateral cualquiera del vaso y seguidamente con el mismo hisopo, en la pared que está situada justo detrás de una de las escaleras de acceso y en las esquinas. El hisopo se conserva en un recipiente de transporte, cerrado herméticamente y manteniendo la humedad hasta su uso (Fig.4).

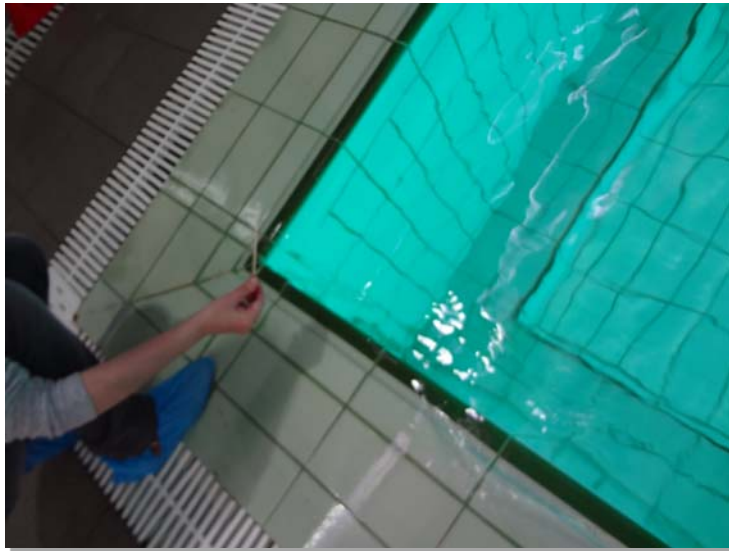


Fig. 4 Toma de la muestra del biofilm de las paredes con hisopo.

Otras medidas de interés, que también son tomadas en ese mismo momento, son la temperatura con un termómetro Minitherm Hi 8751. (-40/150)(Fig.5), el cloro libre con un fotómetro Photometer PH-11 Macherey Nager y el pH con el kit Hi 96710. En algunos spas, con objeto de evitar la formación de subproductos derivados de cloro que resultan irritantes o molestos, la desinfección del agua se realiza con bromo, por lo que se toman datos de bromo libre.

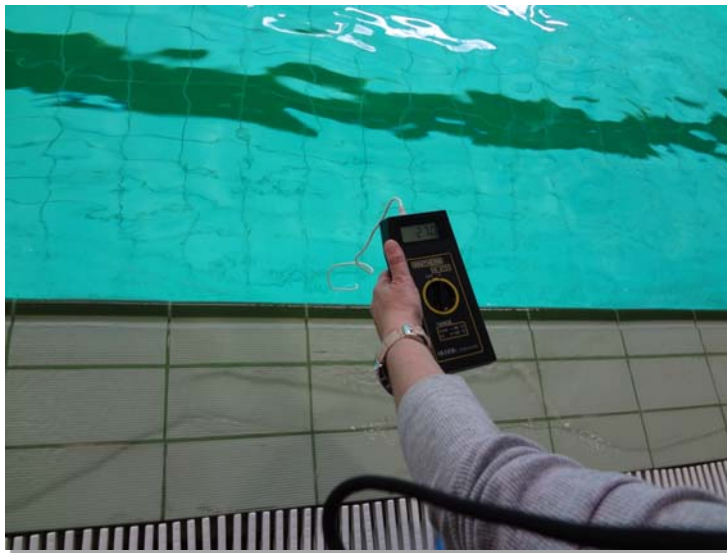


Fig. 5. Medida de los valores de parámetros físicos ( $T^{\circ}$ ).



## 1.2. TEMPORALIZACIÓN

La toma de muestras de *fuentes ornamentales* y demás puntos detallados en la tabla1, se llevó a cabo de junio de 2008 a junio de 2010.

La toma de muestras de agua en las *piscinas cubiertas*, se realizó en el mes de mayo de 2012, en las primeras horas de la mañana y durante la utilización de las instalaciones por los usuarios. Seguidamente, parte de las muestras fueron remitidas al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad de Zaragoza y el resto, al Instituto Municipal de Salud Pública, para el estudio microbiológico.

Las actividades realizadas en ese momento en las instalaciones, eran natación libre y acuagim de adultos, no habiendo usuarios menores o con problemas psicomotores o de retención de esfínteres utilizando las piscinas.

Las muestras en las *piscinas descubiertas o al aire libre* fueron obtenidas durante el mes de julio del año 2012, alrededor del mediodía y de lunes a viernes, ya que según las estadísticas de años anteriores, y como pudimos comprobar en las que se obtuvieron de ese año, corresponden a los momentos de mayor afluencia de usuarios. (<http://www.zaragoza.es/ciudad/deporte>)

## 2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE AGUA

### 2.1 Medios de cultivo utilizados (Schuster FL, 2002)

**Agar Bacteriológico tipo europeo** (Difco laboratories, Michigan, USA): Medio sólido utilizado en la elaboración de agar no nutritivo.

**Solución salina de Neff's Modificada (PAS):** Usada en la preparación del agar no nutritivo y para transferencia de amebas crecidas en agar (NaCl 1.20g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.04g, CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O 0.04g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.42g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.36g/ 1 Litro de agua destilada).

**Agar no nutritivo (ANN):** 100 ml de solución PAS, 900 ml de agua destilada, 15g de agar Bacteriológico.

**Proteasa Peptona** (Difco laboratories, Michigan, USA): producido por digestión enzimática de proteína y empleado en la preparación de PPYG.

**Yeast Extrac** (Difco laboratories, Michigan, USA): Fuente de vitamina B, usado en la preparación de PPYG.

Todos los medios de cultivo se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante, siendo suplementados con antibióticos cuando el cultivo lo requería.

La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 1 atmósfera de presión, 120 °C, durante 15 minutos.

### 2.2 Condiciones de cultivo

La muestra de agua, en las siguientes 24 -48 hs., se filtra en rampa de filtración Millipore y utilizando el kit Microfil<sup>®</sup> Filtration Funnels con S-pack<sup>™</sup> con un filtro estéril de 0,7 µm de poro y 47 mm de Ø. El filtro se lava y centrifuga durante 10 min. a 1.750 rpm, en un tubo Falcon estéril con solución salina. El sedimento se inoculara en el centro de una placa de Petri con agar no nutritivo, en cuya superficie se han distribuido 100 µl. de

suspensión de la bacteria *Escherichia coli* inactivada por calor (ATCC 25922) como nutriente.

Para inactivar *Echerichia coli* se preparó una suspensión de la bacteria al 2 de la escala de McFarland, en suero fisiológico y se calentó a 65°C durante al menos 10 min.

Al mismo tiempo, el filtro fue depositado con la superficie de filtrado en contacto con el agar, en otra placa de ANN con *E. coli*, y retirado a las 24 horas. Este procedimiento se lleva a cabo para comparar el rendimiento, entre ambos métodos. Debido a que se observó un mayor rendimiento en la detección de amebas sembrando el filtro una vez lavado con solución salina y centrifugado, se continuó con este procedimiento para procesar el resto de las muestras.

Las placas se incubaron a 30°C, observándolas al microscopio diariamente y tomándolas como positivas cuando se observa crecimiento de amebas o como negativas si no se observó crecimiento en al menos 15 días.

### **3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE AVL**

#### **3.1 Identificación morfológica de AVL**

##### **Por Microscopía Óptica**

Las placas preparadas e inoculadas como se comenta en el apartado anterior, fueron incubadas a una temperatura de 30°C y controladas por visión directa con el microscopio a 10X cada 24, 48, 72hs y así diariamente hasta un mínimo de 15 días.

Para realizar la identificación morfológica de los trofozoitos y/o quistes, se tomaron en cuenta inicialmente los criterios morfológicos documentados por Smirnov and Goodkov (1999), que proponen una lista de 19 morfotipos básicos para miembros de la clase Lobosea, subclase Gymnamoebia. La identificación morfológica fue complementada utilizando las claves de identificación de Page (Page, 1988).

Al tratarse de muestras ambientales, es frecuente encontrar contaminación por hongos. En este caso se realizan varias resiembras procurando eliminar la contaminación y si no es posible, se clasifica como positiva por morfología, se desecha y no se continúa con el procesamiento de la muestra.

#### **3.2 Obtención de clones**

Para aislar una especie y evitar muestras mixtas, se seleccionaron, por visión directa en microscopio a 10X aumentos, los quistes que morfológicamente tienen las mismas características y los trofozoitos similares entre sí. Se selecciona y recorta del medio una superficie de 3x3 mm, para tener seguridad de que se trata de una misma especie y se siembra en otra placa. Cuando se observa crecimiento de la zona más

externa, se selecciona un fragmento y se repite el mismo procedimiento 3 veces, lo que asegura la obtención de una sola cepa (Page 1988). (Fig. 6)

Si en una misma placa se identifican trofozoitos o quistes con morfología diferente, se seleccionan e inoculan en placas diferentes.

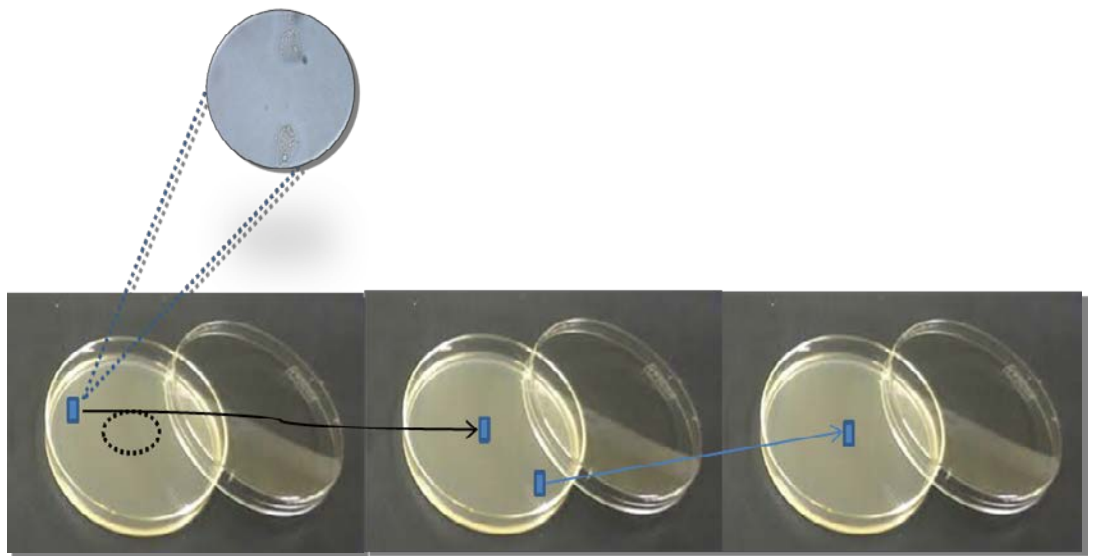


Fig. 6 Obtención de clones de una cepa en cultivos sucesivos.

### 3.3 Identificación por técnicas de biología molecular

Para la identificación de géneros y el genotipado de Amebas de Vida Libre se llevaron a cabo técnicas de biología molecular.

La técnica utilizada fue la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que consiste en una amplificación específica de ácidos nucleicos.

Para este procedimiento es necesario previamente realizar la extracción de ADN de los organismos a identificar.

### 3.3.1 Extracción de ADN para amebas de vida libre

La técnica utilizada, en un primer momento, fue la extracción con fenol-cloroformo (técnica modificada de Ausubel et al., 1993), y posteriormente con métodos comerciales basados en la unión del ADN a membranas de gel de sílice, siguiendo un proceso que se puede resumir como sigue:

- a. Obtención y almacenamiento de la muestra
  - b. Ruptura de las estructuras que contienen el material genético
  - c. Separación del material genético de los componentes homogenizados
  - d. Precipitación de los ácidos nucleicos
  - e. Purificación
  - f. Elución
  - g. Preservación
- a. La placa de Petri con el cultivo de la ameba se lava por fricción, con 2ml de solución salina y un asa estéril de vidrio, recogiendo la suspensión en un tubo eppendorf de 1,5 ml, que se centrifuga a 6000 rpm durante 10 min. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 500 µl. de suero fisiológico estéril (SFE) para la posterior extracción de ADN. Para la extracción se utilizó el kit comercial IBIAN de columna en gel de sílice, que se basa en el anclaje del ADN a una membrana de gel de sílice, en presencia de sales caotrópicas.
  - b. Consiste en la liberación de los ácidos nucleicos de las células. Para esto se utilizan soluciones de lisis que generalmente contienen proteasas o sustancias caotrópicas que degradan las estructuras protectoras, y emulsificantes de los lípidos presentes en membrana externas y endomembranas. El tratamiento con Proteinasa K y RNAsa en tampón de lisis a una temperatura de 52°C durante 24 hs, antes de los procedimientos comerciales, proporciona un aumento significativo en

las tasas de detección. Se trata de una modificación de la técnica, propuesta por Goldschmidt (Goldschmidt et al., 2008).

- c. Bajo condiciones nativas, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen la solubilidad del ADN en soluciones acuosas. Con la adición de iones caotrópicos a los ácidos nucleicos, se destruye esta estructura ordenada de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN.
- d. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílica de las columnas.
- e. Las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.
- f. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana.
- g. Una vez solubilizado el material, éste se deberá repartir en alícuotas, que se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa es un método de síntesis de ADN *in vitro* con el que un segmento particular de éste, es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores. Su replicación se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes períodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtiene, en cuestión de horas, millones de copias de la secuencia deseada de ADN. Esta enzima se obtiene

de una bacteria que vive en aguas termales y que posee una ADN polimerasa que realiza su función a altas temperaturas.

El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde.

Para llevar a cabo la PCR se necesita:

- ✓ ADN diana de doble cadena
- ✓ La enzima de polimerización (TaqADN polimerasa).
- ✓ Iniciadores de la reacción que son dos oligonucleótidos o iniciadores específicos para el fragmento que se quiere amplificar:

Las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son los cebadores o primers de la reacción. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ).

Las enzimas ADN polimerasas, van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de cuatro desoxirribonucleósido trifosfato (dNTPs).



## PCR para la identificación y genotipificación de *Acanthamoeba spp*

---

Se utilizaron varios métodos:

### 1. PCR del amplicón ASA.S1 del gen 18SrADN (423 a 551-pb)

Este amplicón se obtiene mediante PCR con los cebadores JDP1 y JDP2 Tabla 2 (Schroeder et al., 2001). Se analizaron 2 µl. de ADN molde, en un volumen final de 50 µl. La PCR fue llevada a cabo en una habitación independiente y con agua estéril, para evitar contaminaciones.

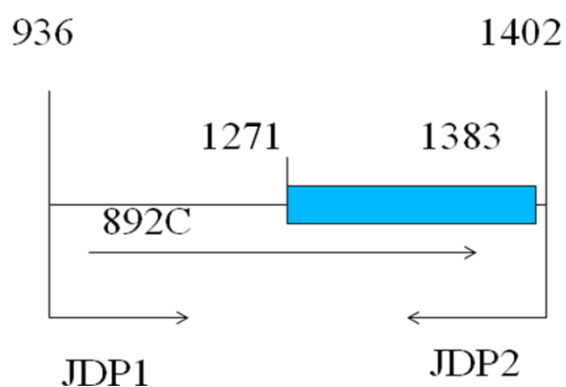


Fig.7 Secuencia de la Región ASA. S1

Con un volumen final de 50 µl. la mezcla de reacción comprendía, 1,5 U Taq polimerasa en buffer x1, MgCl<sub>2</sub> 4mM (BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España), primers JDP1/JDP2 500nM y dNTPs 250 mM (Promega Corporation, USA)

El programa de amplificación comprende 45 ciclos en las siguientes condiciones:

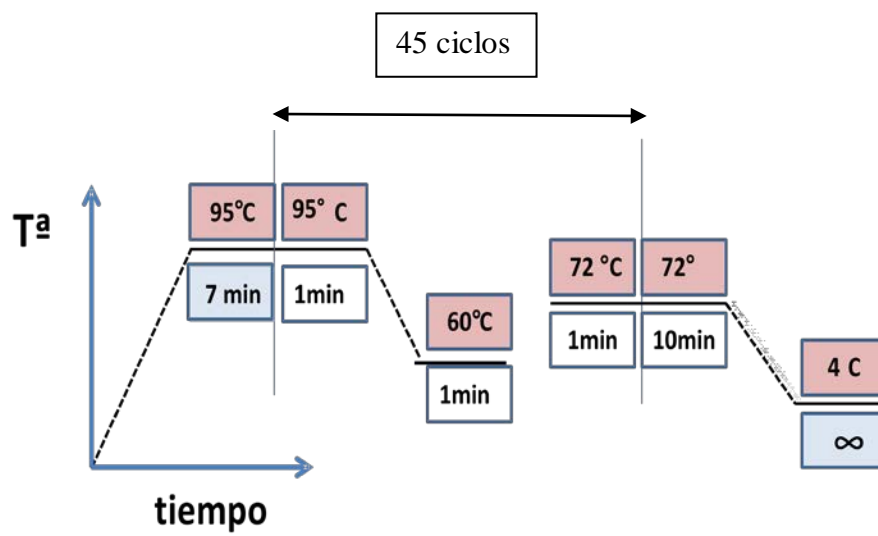


Fig.8 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación JDP (Schroeder et al., 2001)

## 2. PCR *Acanthamoeba* spp. 18S rADN

Para identificar las muestras positivas para la observación microscópica, que no amplificaron los fragmentos indicados en los apartados anteriores, se utilizaron los cebadores ACAN 18SFO y ACAN 18SRO 300 nM. Tabla 2 (Nuprasert et al., 2010). Se analizaron 2µl. de ADN molde en un volumen final de 30µl. con 1,5U Taq. Polimerasa en tampón x1, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España) y dNTPs 200µM (Promega Corporation, USA). Estos cebadores son específicos para *Acanthamoeba*.

El programa de amplificación comprende 40 ciclos en las siguientes condiciones:

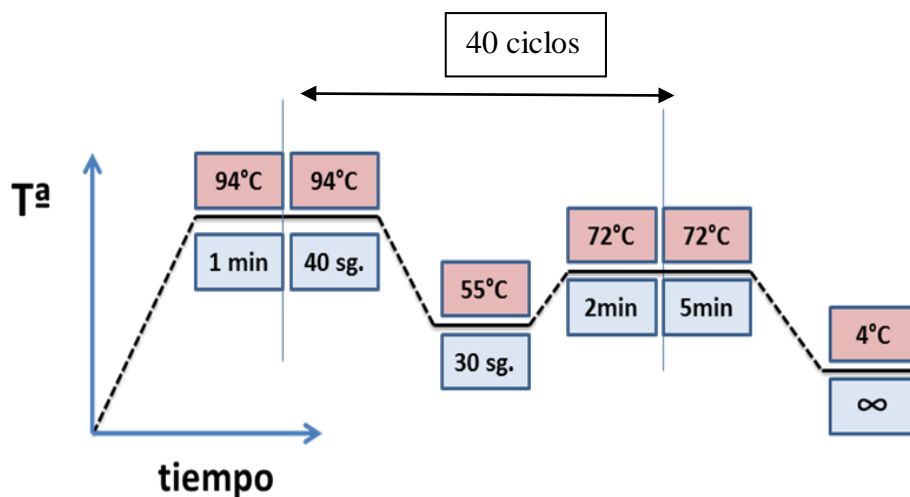


Fig. 9 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación ACAN. (Nuprasert et al., 2010)

## PCR para Amebas de Vida Libre (AVL)

### 1. PCR de la región conservada del gen 18S rADN

Para amplificar las regiones conservadas del 18S rADN, se utilizaron los cebadores en concentración 800nM, P-FLA-F y el reverso primer P-FLA-R Tabla 2 (Tsvetkova et al., 2004). Se analizó 1  $\mu$ l. de ADN molde, en un volumen final de 25  $\mu$ l. con 1,5 U de Taq polimerasa en tampón X1(BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España),  $MgCl_2$  3mM (BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España) y dNTPs 200 $\mu$ M (Promega Corporation, USA). Esta reacción es específica para amebas de vida libre, con inespecificidad de género, aunque algunos de ellos como *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba* amplifican preferentemente sobre otros.

El programa de amplificación comprende 40 ciclos en las siguientes condiciones:

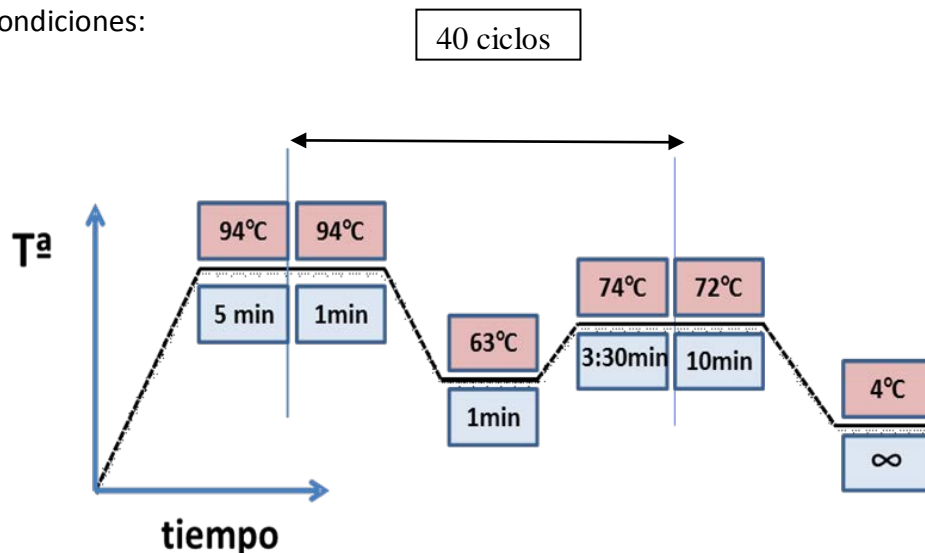


Fig. 10 Distribución de tiempo y temperatura del programa FLA (Tsvetkova et al., 2004).

Las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores de ADN Perkin-Elmer Cetus (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) y Bio-RAD Gene Cyclor™ (Bio-RAD, La Coquette, Francia). Los reactivos de PCR fueron suministrados por Promega (Madison, WI, USA) y por Isogen Biosciencie (De Meer, The Netherlands)

### **PCR para la identificación y genotipificación de *Naegleria* spp.**

---

#### **1. PCR para la región ITS y 5.8S rADN**

Para la amplificación de la región ITS (ribosomal internal transcript) y 5.8SrADN de *Naegleria*, se utilizó la PCR-multiplex descrita por Pelandakis & Pernin (2002)

Los cebadores o primers utilizados fueron ITS-1 y ITS-2, y los cebadores designados específicamente para detectar *Naegleria fowleri*, Fw1 y Fw2. Tabla 2

Las muestras que se seleccionaron para este procedimiento, corresponden a las piscinas cubiertas y al aire libre, partiendo del ADN extraído del agua utilizado para la identificación de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.

Se analizaron 5µl de ADN molde en un volumen total de 50 µl. con los primers para la región conservada ITS-1 e ITS-2 (Tabla 2) (Isogen life science, Netherlands) en concentración final de 400nM y los primers específicos Fw1 y Fw2 (Isogen life science, Netherlands) en concentración 800nM, 1,5 U Taq polimerasa en tampón 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España) y dNTPs 200µM (Promega Corporation, USA).

10µl por muestra del producto de amplificación, fueron analizados por electroforesis.

*El programa de amplificación* comprende 35 ciclos en las siguientes condiciones:

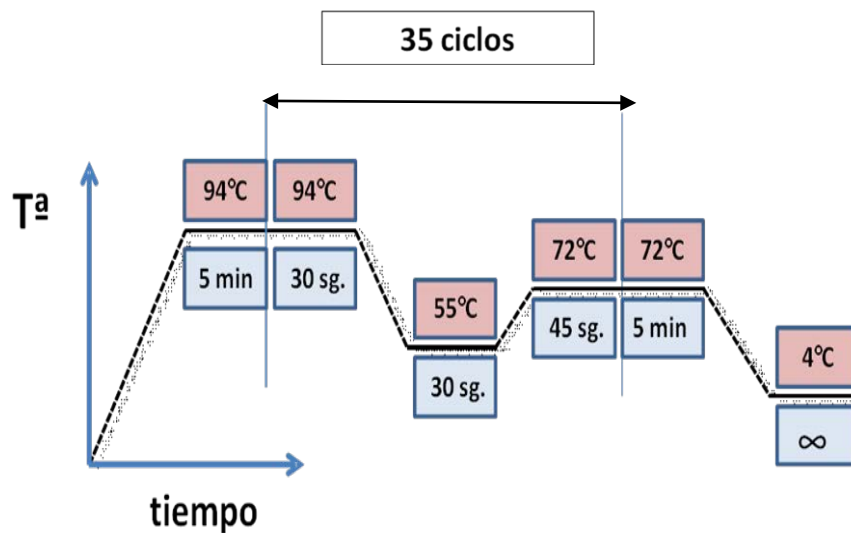


Fig. 11 Distribución de tiempo y temperatura del programa ITS  
(Pelandakis & Pernin; 2002)

## PCR para EUKARIOTAS

---

Para identificar las muestras positivas para la observación microscópica, que no amplificaron para los fragmentos indicados en los apartados anteriores, se utilizaron los cebadores EUK1 y EUK2, (Tabla 2) que amplifican las regiones conservadas del 18S rADN ,descrita por De Long et al., 1992 , con algunas modificaciones. Se analizó 5 µl. de ADN molde, en un volumen final de 50 µl. con 2,5 U de Taq polimerasa en tampón X1(BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (BIOTOOLS lab, S.A, Madrid, España)

y dNTPs 200 $\mu$ M (Promega Corporation, USA) con los primers EUK1 y EUK2 200mM (Isogen life science, Netherlands).

10 $\mu$ l por muestra del producto de amplificación, fueron analizados por electroforesis.

*El programa de amplificación* comprende 40 ciclos en las siguientes condiciones:

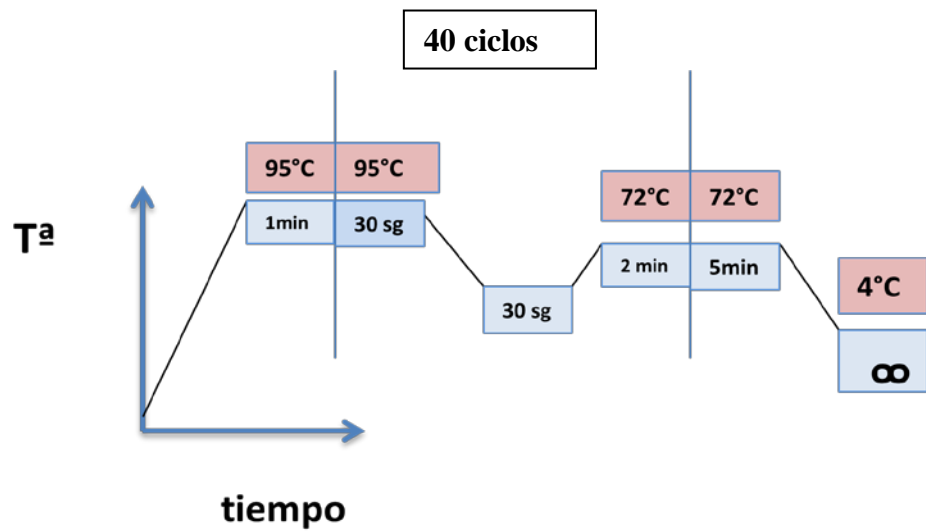


Fig. 12 Distribución de tiempo y temperatura del programa EUK  
(De Long. et al 1992)

## Materiales y Métodos

ORGANISMO	REGION DIANA	SECUENCIA 5 → 3	TAMAÑO (pb)	REFERENCIAS
<i>Acanthamoeba</i>	ASA.S1	JDP1 GCCCAGATCGTTTACCGTGAA JDP2 TCTCACAAGCTCTAGGGAGTCA	500	Schroeder et al. 2001
<i>Acanthamoeba</i>	18SrADN	ACAN 18SFO ACAN 18SRO	2000	Nuprasert et al. 2010
<i>Hartmannella</i> v <i>Naegleria fowleri</i> <i>Vanella spp.</i> <i>Vahlkampfia ovis</i> <i>A. castellani</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. hatchetti</i> <i>A. comandonni</i> <i>A. astronyxis</i>	18SrADN region conservada	P-FLA-F CGCGGTAATCCAGCTCCAATAGC P-FLA-R CAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTAAC	800-1500	Tsvekova et al. 2004
<i>Naegleria spp</i>  <i>N. fowleri</i>	ITS / 5.8S gen ribosomal	ITS 1 GAACCTGCGTAGGGATCATT ITS 2 TTTCTTTTCTCCCTTATTA  Fw1GTGAAAACCTTTTTCCATTACA Fw2AAATAAAAGATTGACCATTGAAA	400-453	Pelandakis et al. 2002
Eukariota	18SrADN region conservada	EUK-F AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCAT EUK-R GCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Variable	De Long et al., 1992

Tabla 2. Relación de genes diana y secuencias utilizadas para las reacciones de PCR



### 3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa

Consiste en la separación electroforética de ADN en un gel de agarosa. Se basa en la migración unidireccional de esta molécula a través de una matriz porosa cuando se aplica un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo en medio tamponado a pH 8. A este pH el ADN tiene una carga negativa y migra desde el polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). La movilidad electroforética del ADN depende, sobre todo, de su tamaño y conformación y se ve poco afectada por la composición de bases o por la secuencia.

#### Preparación de un gel de agarosa

La concentración de agarosa que se utiliza está condicionada por el tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Para visualizar los fragmentos de ADN amplificado por PCR la concentración de agarosa fue del 1,5%.

El gel se preparó disolviendo agarosa (Agar Gel Type IME, Linus) en TBE X 0.5 (Tris 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 0.001 M, pH 8) y llevando a ebullición. Se añadió una solución acuosa de bromuro de etidio (Sigma, Mo, USA) a una concentración final de 0.5 µg /ml y se colocó en una bandeja de electroforesis, previamente sellada y con el correspondiente molde para formar los pocillos. Tras la solidificación del gel, se retiró el molde y se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TBE X 0.5.

#### Electroforesis

La muestra se preparó mezclando 5µl. ADN con 2 µl. de la solución de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0.05%, azul de bromofenol). Cada muestra se cargó en pocillos independientes del gel.

También se cargaron 5 µl. del marcador de peso molecular ADN del Fago λ *Pst*I en otro pocillo (116 microgramos/ml, Tampón Multi-core 1x,

enzima *Pst*I 200U (Promega Corporation, USA), agua mQ estéril 240 µl. (Incubar 24hs a 37°C en baño termostatzado).

La electroforesis se desarrollo a 95V de forma constante y durante un tiempo que varió de 45 min a 1h y media, según el número de pocillos dispuestos, o del tamaño del gel en una cubeta (Bio-Rod Mod 250/2.5; 45v).

### **3.3.4 Visualización**

La visualización de los fragmentos de ADN se consigue mediante la incorporación al gel de un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que se intercala entre las dos cadenas de ADN. Este reactivo revela la presencia de una banda de ADN al ser iluminado con luz ultravioleta de longitud de onda corta en mm. (Transluminador de Vilbert Lourmat) (6x8W-312 nm; power 55W).

### **3.3.5 Purificación del producto de PCR**

Los productos de PCR se purifican a partir de las bandas del peso molecular que corresponda y que se observan en el gel de agarosa, utilizando el Kit comercial GFXTM PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Los principios en los que se basa son los siguientes:

- \* Captación de la muestra: el buffer que se incorpora al gel de agarosa que hemos cortado con la amplificación de la molécula de ADN, tiene como fin, eliminar proteínas y disolver la agarosa.

- \* Una vez en la columna de sílice, se realizan lavados sucesivos para eliminar sales y contaminantes de la membrana.

- \* Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales

(ligeramente alcalinos) liberándolos así de la membrana, utilizando buffer estéril y libre de ADNsas, para las muestras que van a ser secuenciadas.

### **3.3.6 Visualización**

La visualización se realiza en gel de agarosa con bromuro de etidio y el marcador de peso molecular EasyLadder I (Bioline, S.A) con un rango de 100 a 2000 pb.

### **3.3.7 Secuenciación**

El ADN purificado fue secuenciado en el centro secuenciación y análisis genéticos (C.A.G.T) de Zaragoza.

Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas ChromasLite, BioEdit® y la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para el alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas con las registradas en la base de datos GenBank. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)

### **3.3.8 Análisis filogenético**

El análisis filogenético se basó en la comparación de un fragmento del 18S rADN (2300 a 2700 pb) denominado fragmento diagnóstico DF3 (Stothard et al., 1998; Stothard et al., 1999).

Las secuencias de los fragmentos diagnósticos de *Acanthamoeba* se alinearon con el programa BioEdit® para comparar aquellas que se encuentran en el mismo grupo.

A partir del alineamiento de estos fragmentos se obtuvieron los árboles filogenéticos por el método neighbor-joining (NJ) con un Bootstrap de 1000 replicaciones utilizando el programa MEGA6 (Molecular Evolution Genetic Analysis softwear) (<http://megasoftware.net/>).

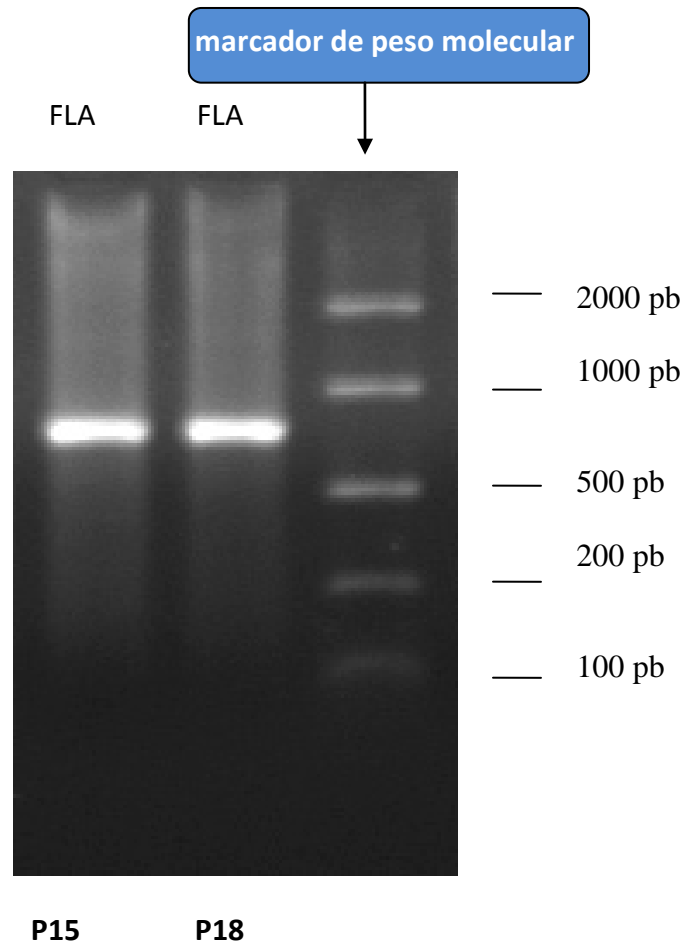


Fig. 13 Visualización en gel de agarosa al 1,5%, de la amplificación de ADN purificado de FLA- PCR. Amplificación de secuencias correspondientes al género *Hartmannella* (800 pb).

## **ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA DEL GÉNERO *ACANTHAMOEBA* SPP. Y *HARTMANNELLA* SPP.**

Como se ha expuesto en la introducción, existen estudios acerca de los factores y características que confieren a las amebas mayor o menor grado de patogenicidad y virulencia. Entre éstos, se encuentra la capacidad de adaptación al medio a distintas temperaturas, crecimiento en medios con diferente osmolaridad y crecimiento en medio axénico, y por supuesto su capacidad para crear infección *in vitro*. Todos estos factores se han propuesto como demostrativos de la virulencia de las cepas.

Se estudió tanto en el género *Acanthamoeba* como *Hartmannella*, la termotolerancia, osmotolerancia y crecimiento en medio axénico. Además, se comprobó la capacidad de dos cepas de *Acanthamoeba* spp., una de ellas aislada en las piscinas y la otra procedente de una muestra clínica, de causar queratitis "*in vivo*" en conejos.

### **1. Selección de las muestras**

Para el estudio de adaptación a los cambios físicos del medio, se seleccionaron todas aquellas cepas, procedentes tanto de las fuentes como de piscinas y muestras clínicas, que resultaron en la identificación molecular como *Acanthamoeba* spp. (por PCR y secuenciación). La prueba se realizó también para 5 cepas de *Hartmannella* spp. tomadas al azar para comprobar posibles diferencias.

Piscinas cubiertas: P3, P8 (*Acanthamoeba* spp.) P5, P12, P14, P15 (*Hartmannella* spp.)

Piscinas descubiertas: P28, P31, P43, P46, P79, P84 (*Acanthamoeba* spp.) P37 (*Hartmannella* spp.)

Muestras clínicas: MC1, MC2 (*Acanthamoeba* spp.).

Para el estudio de virulencia de dos cepas de *Acanthamoeba* spp. “*in vivo*”, se seleccionaron a partir del medio axénico aquellas cepas que demostraron mayor virulencia por su capacidad de adaptación al aumento de la temperatura y osmolaridad del medio y su capacidad de crecer en cultivo axénico. De esta forma se quería demostrar la capacidad patógena de las AVL que se encuentran en el agua de las piscinas y poder comprobar la similitud en la clínica que produce la cepa medioambiental y la clínica, cuya capacidad patógena en el hombre estaba comprobada.

### **2. Muestras en medio axénico**

Partiendo de un cultivo de aproximadamente una semana, en placa con ANN y *E. coli*, se procedió a recoger la ameba, mediante lavado de la placa con 1 ml. de solución salina, centrifugando durante 10 min. a 6.000 rpm. El sobrenadante se eliminó y al precipitado se le agregaron 500µl. de solución salina acidificada con HCl hasta pH 3, incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez centrifugada esta suspensión durante 10 min. a 6000 rpm, el precipitado resultante se lavó con 500ml. de solución salina, centrifugando de nuevo y desechando el sobrenadante. El cultivo axénico se inicia inoculando el precipitado obtenido en 5 ml de medio PPYG (Schuster, 2002;) al que se añaden 15 µl de antifúngico (10mg/ml) y antibióticos para eliminar cualquier contaminación; 100 µl de Estreptomina (10 mg/ml) y 20 µl de Cefalosporina (10 mg/ml) y se cultiva a 30 °C, durante al menos una semana-15 días.

Para comprobar el crecimiento de amebas, se agita enérgicamente y deposita una gota en un portaobjetos y se observa al microscopio óptico a 40X y 100X aumentos. Si se observa turbidez en el medio se considerará presencia de contaminación bacteriana y en ausencia de trofozoitos o quistes, al cabo de aproximadamente al menos 15 días, se considerará un

crecimiento negativo en medio axénico. El crecimiento positivo es interpretado como factor de virulencia

### 3. Prueba de osmotolerancia

Para comprobar la osmotolerancia de las cepas de *Acanthamoeba* se prepararon placas en medio ANN al 1,5% con manitol (Panreac; Barcelona, España), en concentraciones de 0,3 M, 0,5M y 1M con una suspensión de *E. coli* ATCC 25922 inactivadas por calor (Khan et al., 2002).

La prueba se realizó en 7 cepas procedentes de piscinas al aire libre, 2 de las piscinas cubiertas y 2 cepas clínicas, identificadas todas ellas como *Acanthamoeba*.

A partir de cultivos en placa de las amebas, se procedió a su lavado por arrastre con solución salina (1ml.) y asa estéril, recogiendo el lavado en un tubo eppendorf de 1,5 ml y centrifugando 10 min. a 6.000 rpm (centrífuga Spectrofuge 24D; Labnet International). Una vez descartado el sobrenadante, se realizó el recuento de células para calcular la concentración de la suspensión del sedimento en el líquido residual, utilizando para ello una cámara de Neubauer, en la que se introdujeron 10 µl de la suspensión cada cepa, y un cuenta células.

El cálculo se realizó de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Total de células} \times 10^4}{4} = \text{cel/ml}$$
$$X = \frac{10^3 \text{ células } 10^3 \mu\text{l/ml}}{\text{n}^\circ \text{ células/ml}}$$

X corresponde a los µl que hay que depositar de cada cepa en la placa para obtener un inóculo de 1000 células. Dicha cantidad se inoculó en el centro de cada placa, marcando el halo inicial, y se incubó a 30°C

observándose cada 24, 48 y 72 hs. Posteriormente, se midió el diámetro de crecimiento en los tiempos indicados, utilizando un microscopio óptico (ZEISS West) y considerándose crecimiento positivo si el diámetro era superior al marcado inicialmente a tiempo cero, normalmente de unos 5 mm. (Fig 14).

Para definir y diferenciar la tolerancia al medio se consideró:

- diámetro < 5 mm. ....tolerancia negativa
- diámetro > 5 mm.....tolerancia positiva

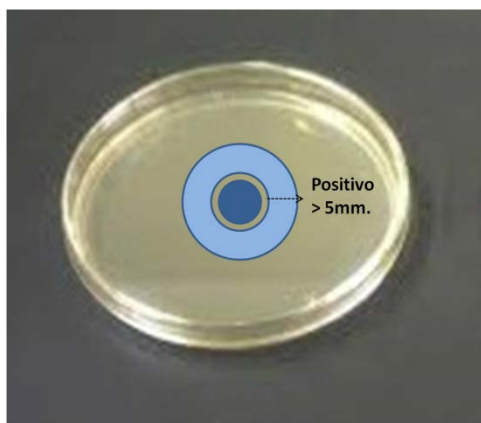


Fig. 14 Esquema de valoración de la tolerancia de AVL a la osmolaridad del medio

#### 4. Prueba de termotolerancia

A partir de los cultivos, se procedió de la misma manera que para la prueba de osmotolerancia.

Se depositaron en el centro de la placa con agar ANN y *E. coli* inactivada por calor, 1000 células de la ameba a ensayar. Posteriormente, dichas placas fueron incubadas a 30, 37, y 42 °C, observando la presencia y



crecimiento de trofozoitos y quistes, a las 24, 48, 72 horas y 1 semana (Khan et al., 2002).

Las observaciones son cualitativas controlando el aumento del diámetro del inóculo y cuantificando aproximadamente el crecimiento tanto de trofozoitos como de quistes registrándolo como: +/- (presencia de trofozoitos positiva o negativa), +/- (presencia de quistes positiva o negativa), interpretando el crecimiento abundante como +++, el moderado como ++, y el nulo – .

Una vez comprobado lo sucedido tanto con los trofozoitos como con los quistes a 42°C, se volvió a cultivar a 30°C, como temperatura más favorable, para comprobar si los quistes eran viables o no. Si eran capaces de desenquistarse y se observaban trofozoitos, indicaba que el quiste realmente permanece viable y por lo que se produce crecimiento cuando las condiciones son favorables. Por el contrario, si transcurridos 15 días no se obtenía presencia de trofozoitos y por lo tanto crecimiento, se consideró que los quistes eran inviables y que por lo tanto no habían conseguido resistir las altas temperaturas.

## 5. Ensayo “*in vivo*” de virulencia de *Acanthamoeba* spp.

Este estudio se diseñó en colaboración con el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”, el Departamento de Ingeniería Mecánica de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura, el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria y el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.

### Objetivo

El objetivo del ensayo “*in vivo*”, fue comprobar la capacidad patógena de dos cepas de *Acanthamoeba* procedentes de una muestra ambiental y otra muestra clínica.

### Elementos del ensayo

Para llevar a cabo el ensayo “*in vivo*” se seleccionaron dos cepas de *Acanthamoeba*, previamente identificadas como *Acanthamoeba* genotipo T4 por PCR y secuenciación. Las cepas se inocularon en medio axénico PPYG, con el método expuesto anteriormente, y se mantuvieron 1 semana en el cultivo a 30°C. El desarrollo de las amebas en este medio libre de bacterias y otros microorganismos, nos permite asegurar el resultado del ensayo.

Se seleccionaron dos cepas, una ambiental procedente de agua de una piscina al aire libre donde se realiza el estudio, y otra procedente de una muestra clínica de un raspado corneal de un paciente con queratitis (P31 y mc2 respectivamente). La utilización de una cepa clínica, nos permitió utilizarla como control del proceso, al mismo tiempo que establecer comparaciones entre ambas cepas.

Los animales de experimentación utilizados fueron dos conejos blancos de Nueva Zelanda, de aproximadamente 5 kg. Las córneas de los

animales se examinaron para asegurarse de la ausencia de cualquier anomalía.

Para reproducir las circunstancias en las que se puede producir la infección en los seres humanos, se utilizaron lentes de contacto para facilitar la contaminación de la córnea.

### Método de preparación del inóculo

La preparación del inóculo de las amebas se realizó tras una semana aproximadamente de cultivo en el medio PPYG. El medio fue centrifugado a 6.000 rpm durante 10 min. realizando el recuento de células, inoculando 10 µl en una cámara de Neubauer. Se calculó la media (realizando el conteo en las 4 cámaras) y se ajustó la concentración a  $1,5 \cdot 10^5$  cel/ml, teniendo en cuenta la capacidad de la lente que es aproximadamente de 1ml ( Polat et al., 2012). La proporción de trofozoitos era del 80%, muy superior a la de quistes (20%), en el momento de la preparación en ambas cepas.

Cada una de las cepas en las soluciones y a las concentraciones indicadas se incubaron en medio PPYG a temperatura ambiente, en contacto con las lentes en recipientes estériles.

### Método de inoculación

La inoculación fue realizada por el investigador colaborador de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, realizando una erosión con cepillo estéril en el centro de la córnea de aproximadamente 3mm. en un ojo de cada conejo, colocando la lente de contacto y manteniéndose el ojo cerrado por sutura durante 3 días, para evitar infecciones exógenas. El otro ojo se utilizó como control. El animal fue anestesiado durante todo el proceso.

La valoración de la evolución del ojo, se realizó diariamente, con una lámpara de hendidura y registrando fotográficamente la extensión de las lesiones y la aparición de signos clínicos.

El control del raspado corneal se realizó posteriormente a la eutanasia y enucleación de los ojos afectados. Dichas muestras se llevaron al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, donde fueron analizadas mediante varios cultivos en ANN y capa de *E.coli* desnaturalizada por calor e incubando la placa a 30°C durante más de 15 días, para comprobar la presencia tanto de quistes como de trofozoítos.

## **MICROORGANISMOS PATÓGENOS ALBERGADOS EN EL INTERIOR DE LAS AVL.**

Considerando el papel de las amebas de vida libre en la supervivencia y transporte de bacterias que comparten nicho ecológico con ellas, se estudió la presencia de las siguientes bacterias en el interior de las amebas aisladas tanto en aguas de red y fuentes ornamentales como en piscinas cubiertas y de verano: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas* spp, y Cianobacterias tóxicas. Dichas bacterias fueron seleccionadas por su capacidad de causar infecciones en animales y humanos y por su capacidad para formar floraciones o “blooms” en los ecosistemas en que habitan y su toxicidad.

La técnica utilizada fue la **pentaplex-nested PCR** para la detección de patógenos resistentes a las AVL, publicada en 2013 por Calvo et al. Esta técnica se llevó a cabo como resultado de la colaboración entre los grupos consolidados “Biología estructural” del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y el de “Protozoosis entéricas de interés económico y sanitario” del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, ambos de la Universidad de Zaragoza.

Esta PCR utiliza como diana, genes específicos con una diferencia mínima de 80 pb entre los fragmentos amplificados, ofreciendo también la opción de incluir en el estudio *Vibrio cholerae*, aunque en este caso no se ha utilizado ya que esta bacteria no se encuentra habitualmente presente en las aguas de nuestro entorno.

### **1. Muestras estudiadas**

En el estudio de las fuentes ornamentales, se eligieron 16 muestras al azar y en el caso de las piscinas se realizó el estudio en todas las muestras positivas para AVL obtenidas por PCR.

IDENTIFICACIÓN MUESTRAS	PROCEDENCIA
<b>22</b> <b>23</b> <b>69</b> <b>F-28</b> <b>F-20</b> <b>F-21</b> <b>F32</b>	FUENTES ORNAMENTALES
<b>ACS</b>	AGUA CALIENTE SANITARIA
<b>C-1</b> <b>C-3</b> <b>C-4</b> <b>C-6</b> <b>C-7</b> <b>C-9</b> <b>C-10</b> <b>C-11</b>	AGUA CORRIENTE PARTICULAR
<b>TODAS LAS QUE RESULTARON POSITIVAS PARA AVL por PCR</b>	PISCINAS MUNICIPALES  TOTAL MUESTRAS

Tabla 3. Relación de las muestras utilizadas para el estudio de microorganismos patógenos resistentes a amebas.

## **2. Pentaplex-nested PCR *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas* spp y Cianobacterias tóxicas**

Se compone de dos PCR anidadas, que logran un mayor rendimiento del procedimiento.

Para asegurar que el ADN bacteriano detectado, proviene de bacterias endosimbiontes localizadas en el interior de las amebas y no de bacterias que se encuentren adheridas al exterior de su membrana, es preciso realizar 3 ó 4 subcultivos de las amebas, previos a la extracción del ADN. La pentaplex-nested PCR, se realizó a partir del ADN extraído de los cultivos en placa y utilizado para la identificación de las amebas de vida libre, anteriormente explicado.

### **Condiciones de la 1ª PCR**

En el estudio de las fuentes ornamentales y agua de red, la PCR se realizó en las condiciones publicadas. En el estudio de las piscinas municipales, la PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones, modificadas de las originales de la publicación al eliminar del estudio a *Vibrio cholerae* por ser una bacteria que en estos momentos no se encuentra en aguas de España, como ya se ha comentado anteriormente.

Como control positivo se utilizaron una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de origen clínico procedente del hospital Lozano Blesa de Zaragoza, una cepa de *Legionella pneumophila* serogrupo I perteneciente a la colección del Profesor. D. Rafael Gómez-Lus de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, amablemente cedida por él, y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Colección Pasteur).

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl, compuesta por MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,5mM, ADN polimerasa 0,15 U y los primers o cebadores que se indican en la Tabla 1, correspondientes a cada

una de las bacterias estudiadas, analizándose 2µl. de ADN de cada una de las muestras.

Programa de amplificación 1ª PCR comprende 25 ciclos

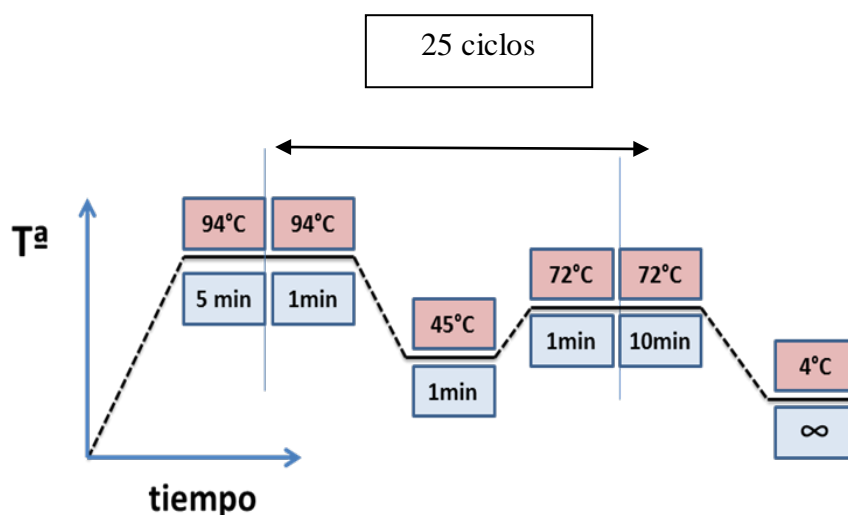


Fig.15 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación de la pentaplex-nested PCR (1ª reacción).(Calvo et al., 2013).

BACTERIA	PRIMERS	SECUENCIA 5' → 3'	CONCENTRACION	TAMAÑO (pb)	REFERENCIA
<i>Legionella pneumophila</i>	Mip-Leg186F	GCA TTG GTG CCG ATT TGG	0,75µM	186	(Roch and Maurin,2005)
	Mip-Leg186R	GYT TTG CAT CAA ATC TTT CTG			
<i>Toxigenic cyanobacteria</i>	McyD-fow	GAG CAT TAA GGG CTA AAT CG	0,5 µM	282	(Calvo L. et al.,2013)
	McyD-rev	CTT GGT TGC TTC ATC AAC TC			
<i>Mycobacterium spp</i>	Hsp65-dir	CCC GTA CGA GAA GAT CGG	1 µM	354	(Calvo L. et al.,2013)
	Hsp65-rev	GAC TCC TCG ACG GTG ATG			
<i>Pseudomonas spp.</i>	R16S-dir	GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT	1 µM	962	(Calvo L. et al.,2013)
	R16S-rev	TCT GTA CCG ACC ATT GTA GC			

Tabla 4. Relación de primers o cebadores utilizados en la multiplex-PCR 1ª reacción.



### Condiciones de la 2ª PCR.

La segunda PCR, con un volumen final por muestra de 25 µl., se realizó en las mismas condiciones de la primera, sustituyendo los cebadores por los indicados en la Tabla 2. Del producto de la 1ª PCR se incorporan 0,5 µl.

Programa de amplificación 2ª PCR comprende 20 CICLOS

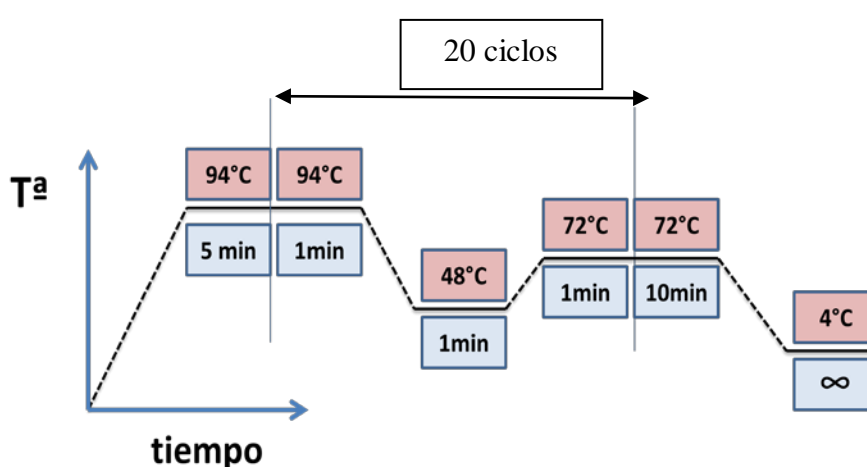


Fig.16 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación de la pentaplex-nested PCR (2ª reacción) (Calvo et al., 2013)

BACTERIA	PRIMERS	SECUENCIA 5 → 3	Concentración	Tamaño (pb)	FUENTE
<i>Legionella pneumophila</i>	N-Mip-dir	GAA GCA ATG GCT AAA GGC ATG CAA	0,75 µM	112	(Calvo et al., 2013)
	SN-Mip-rev	GCT TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA ACT TG			
<i>Microcystis spp</i>	N-McyD-dir	TCA TAG CCC CAT ATC CTT TAG CGG C	0,5 µM	194	(Calvo et al., 2013)
	N-McyD-rev	CTG CTG TAT CTT TAA TTG GCT CGG C			
<i>Mycobacterium spp.</i>	N-Hsp65-dir	GAG CTG GTC AAG GAA GTC GCC	1 µM	300	(Calvo et al., 2013)
	N-Hsp65-rev	GTT GCC GAC CTT GTC CAT CGC			
<i>Pseudomonas spp</i>	N-R16S-dir	GAC GTT ACC GAC AGA ATA AGC ACC G	1 µM	476	(Calvo et al., 2013)
	N-R16S-rev	ACC CAC ATG CTC CAC CGC TTG TG			

Tabla 5. Relación de primers o cebadores utilizados multiplex-PCR 2ª reacción.

### **Electroforesis en gel de Agarosa**

La electroforesis se desarrolla en un gel de agarosa al 2%, preparado en las condiciones citadas anteriormente.

La muestra se preparó mezclando 5µl. ADN con 2µl. de la solución de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0.05%, azul de bromofenol). Cada muestra se cargó en pocillos independientes del gel. Se utilizó como I marcador de peso molecular de 100 pb, el ADN Ladder (50µg) (Biotools B&M Labs. S.A), con bandas entre 100 pb y 1 kb.

### **Visualización, Purificación y Secuenciación**

Siguiendo el mismo método y utilizando los mismos materiales que con las AVL.

## IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS EN AGUAS DE PISCINAS

### *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis*

#### 1. Muestras de agua estudiadas y extracción de ADN

Para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia*, se procesaron las mismas muestras utilizadas para la detección de amebas de vida libre, analizando solo aquellas que resultaron positivas para AVL.

Una vez filtrado el litro correspondiente a cada piscina, el filtro fue lavado con solución salina (15ml) en tubos Falcon, centrifugándolos a 1500 rpm durante 10 min, y tomando 200 µl. del sedimento para detección de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium*.

La extracción de ADN se realizó con los mismos 200 µl. siguiendo las instrucciones del kit comercial IBIAN ADN Stool Kit.

#### 2. Identificación morfológica por microscopía óptica de *Cryptosporidium* spp.

Del sedimento obtenido tras el lavado y centrifugado del filtro, se tomó una gota sobre un portaobjetos y se llevó a cabo una tinción Ziehl-Neelsen modificada para detectar la presencia de ooquistes mediante visión directa al microscopio óptico con aumentos de 40X y 100X

*Técnica de Ziel-Nielsen modificada:*

- Se toma una gota de muestra del sedimento y se coloca en un portaobjetos describiendo un círculo no muy grande.
- Se deja secar
- Se cubre con metanol, se deja secar completamente y fijar con metanol 10 minutos, se pone un trozo de papel encima antes de cubrirlo de fucsina fenicada.
- Se deja actuar la fucsina 20 minutos.

- Se retira el papel y se lava el portaobjetos con agua y posteriormente decolorar con ácido sulfúrico dejándolo actuar 1 ó 2 min.
- Se lava con agua y se cubre con azul de metileno; pasado 1 min. se lava y se deja secar, colocando el portaobjetos en vertical.

### 3. Técnicas moleculares para la identificación de *Cryptosporidium* spp.

La técnica que se describe a continuación se utilizó para identificar las especies y genotipos de *Cryptosporidium* spp. en el agua de las piscinas.

Para todas las muestras se procedió a realizar la técnica de PCR anidada que amplifica el gen de subunidad 18S ribosomal (SSU rRNA) (Xiao et al., 1999). En la primera PCR se obtuvo un producto de 1325 pares de bases utilizando los cebadores SSU1 y SSU2 y la segunda de 826-864 pb con los cebadores SSU3 y SSU4.

GEN	PRIMERS	SECUENCIA	TAMAÑO
SSUrRNA	SSU 1	5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'	1325
	SSU 2	5'- CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'	
	SSU 3	5'GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3	826-864
	SSU 4	5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'	

Tabla 6. Relación de las secuencias de amplificación del gen SSUrRNA

Ambas reacciones se llevaron a cabo, en tubos de 200  $\mu$ l, en termocilcadores MiniCycler TM MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal cycler.

Para la primera PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 25  $\mu$ l: Tampón de reacción (1X) 2,5  $\mu$ l,  $MgCl_2$  (50 mM) 1  $\mu$ l, SSU 1 (10  $\mu$ M) 0,25  $\mu$ l, SSU 2 (10  $\mu$ M) 0,25  $\mu$ l, dNTPs (25 mM) 0,25  $\mu$ l Taq ADN Polymerasa (5U/ $\mu$ l) 0,3  $\mu$ l, ADN 5  $\mu$ l,  $H_2O$  11,25  $\mu$ l

Para la segunda PCR se utilizó la fórmula de reacción, en un volumen final de 50  $\mu$ l.: Tampón de reacción (1X) 5  $\mu$ l  $MgCl_2$  (50 mM), 1,5  $\mu$ l SSU 3 (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l SSU 4 (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l dNTPs (25 mM), 0,5  $\mu$ l Taq ADN Polymerasa (5U/ $\mu$ l) 0,3  $\mu$ l, Producto de la primera PCR 3  $\mu$ l  $H_2O$  30  $\mu$ l.

Las condiciones de las dos PCR son las mismas; únicamente varía el volumen final de la muestra.

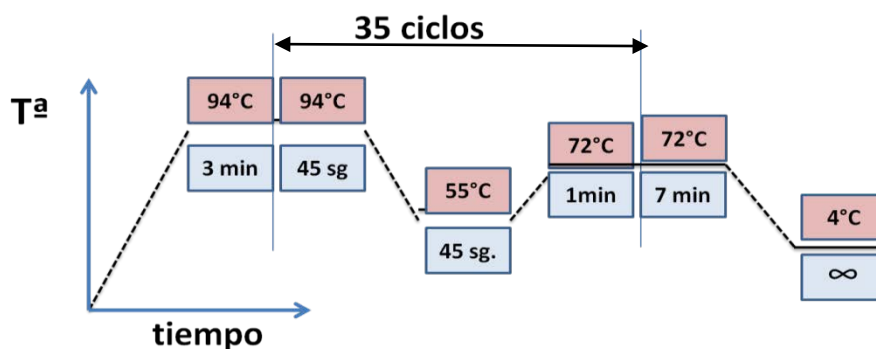


Fig. 17 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación del SSURNA (Xiao et al. 1999).

Los productos de la reacción fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, conteniendo bromuro de etidio como agente intercalante que permite su revelado en transiluminador con luz UV de 312nm.

#### 4. Técnicas moleculares para la identificación de *Giardia duodenalis*

Para detectar *Giardia* se utilizó la misma muestra de agua utilizada para *Cryptosporidium*, que como ya se ha comentado, procedía del lavado del filtro y centrifugado del agua de las piscinas, tomando un volumen de 200 µl, a partir del cual se realizó la extracción de ADN (con Kit-comercial)

*Giardia duodenalis* presenta un alto potencial zoonótico, pero también una gran diversidad genética que se puede observar mediante el análisis de un fragmento del **gen tpi**, que codifica la triosafosfato isomerasa, lo que lo hace adecuado para llevar a cabo la caracterización genética de las cepas de *Giardia* (Ey et al., 1993; Baruch et al., 1996; Monis et al., 1996; Monis et al., 1999). Por esto se llevó a cabo la técnica de PCR que amplifica un fragmento del **gen tpi**, desarrollada por Sulaiman, que utiliza en la primera PCR los cebadores AL3543 y AL3546 obteniendo al final un producto de 605 pb. y en la segunda los cebadores AL3544 y AL3545 con un producto final de 530 pb (Sulaiman et al., 2003).

La fórmula de la reacción para la primera PCR tenía un volumen final de 50µl. El volumen de ADN de la muestra utilizado fue de 5 µl de ADN, 5 µl de buffer 10X (BIOTOOL B&M Labs, S.A), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM ((BIOTOOL B&M Labs, S.A), 0,4 µl. de dNTPs 25 mM (Promega corporation, USA) 2 µl. de cada primer a concentración 10 µM, 0,3 µl. de Taq polimerasa de 5U/µl (BIOTOOL B&M Labs, S.A) y 32,6 µl de agua purificada estéril.

GEN	PRIMERS	SECUENCIA	TAMAÑO
<i>tpi</i>	AL3543	5'- AAATTATGCCTGCTCGTCCG-3'	605
	AL3546	5'- CAAACCTTTTCCGCAAACC-3'	
	AL3544	5'-CCCTTCATCGGTGGTAACTT -3	530
	AL3545	5'- GTGGCCACCACTCCCGTGCC-3'	

Tabla 7. Relación de secuencias de amplificación del gen *tpi*

Las condiciones de amplificación son las siguientes

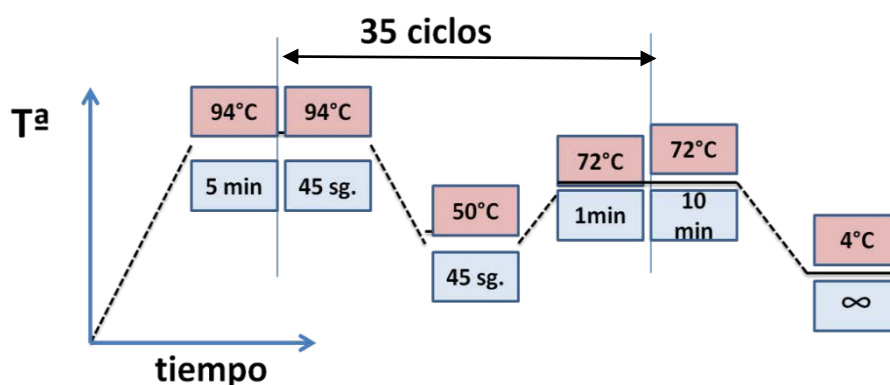


Fig.18 Distribución de tiempo y temperatura del programa de amplificación del gen *tpi*. (Sulaiman et al., 2003).

Para la segunda PCR, la mezcla de reacción tuvo la misma composición que la primera, variando en el volumen de 2,5  $\mu$ l. de ADN diana que se utiliza del producto de la primera PCR, en los cebadores, que en este caso son AL3544 Y AL3545. También las condiciones de amplificación utilizadas fueron las mismas que en la primera PCR, obteniendo un producto final de 530 pb.

Igual que en el caso de *Cryptosporidium*, los productos de la reacción fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, conteniendo bromuro de etidio como agente intercalante que permite su revelado en transiluminador con luz UV de 312nm. Los fragmentos obtenidos fueron purificados mediante el kit GFX™ PCR ADN and Gel band Purification kit (GE, Healthcare) y secuenciados mediante secuenciación directa. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando los programas Chromas, BioEdit y la herramienta Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information (NCBI).



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Definición de variables:

- *Tipo de instalación:* tomando como modelo la clasificación que se hace de ellas en el Real Decreto, han sido clasificadas en *cubiertas y descubiertas*.

Correspondiendo las cubiertas a las instalaciones climatizadas y las descubiertas o al aire libre a las piscinas de verano.

En la primera parte, las muestras de agua corresponden a agua de red procedentes de fuentes ornamentales, aguas de consumo de domicilios particulares, aljibes, fuentes, torres de refrigeración o agua caliente sanitaria. *Lugar de la toma de la muestra:* como se ha explicado anteriormente, de cada vaso se han tomado 3 muestras de la orilla (o *superficie*), a *30 cm. de profundidad y con hisopo*, del biofilm de las paredes.

- *Tipo de vaso:* en las piscinas cubierta, se han clasificado según la actividad que se realiza, en *competición, recreativa, enseñanza, jacuzzi e hidromasaje* y en las piscinas descubiertas según el tamaño en *grande, mediana, pequeña y chapoteo*.
- *pH:*  $\leq 7,1$  cifras por debajo de las cuales el agua puede ser irritativa para piel y mucosas y corrosiva para los metales,  $[7,2 - 7,6]$  valores óptimos para que el  $\text{Cl}^-$  realice su función y  $\geq 7,7$  valores que provocan la precipitación de sales
- *Cloro libre o residual:* este parámetro representa la concentración de cloro disponible para inactivar microorganismos causantes de enfermedades. Los valores que se han registrado están expresados

en mg/l y se ha considerado [0,6-1] como valores óptimos y < 0,6 ó > 1,1 como no recomendables.

- *Género y genotipo de Amebas Vida Libre*: las técnicas de PCR utilizadas, identifican en principio géneros de AVL patógenos para el ser humano. Los que han sido identificados como tales para el análisis estadístico son *Acanthamoeba* spp, *Hartmannella* spp y *Naegleria* spp. En los casos en los que se han identificado otros géneros de AVL no patógenos, se han clasificado como positivos para AVL e indicando en el género como "Otra". Los genotipos de *Acanthamoeba* se clasificaron de T1-T18.
- *Temperatura*: Ha sido determinada únicamente en las piscinas cubiertas ya que las descubiertas no mantienen una Tª constante a lo largo del día.
- *Identificación de protozoos: Giardia duodenalis Cryptosporidium* spp. Registrándose la presencia, como positiva o negativa.
- *Bacterias patógenas albergadas por AVL*: se han definido seis variables para su estudio.
  - 1. Presencia de bacterias: positiva-negativaY de forma independiente:
  - 2. *Legionella* spp: Positivo-negativo
  - 3. *Pseudomonas aeruginosa*. Positivo-negativo
  - 4. *Mycobacterium* spp. Positivo-negativos
  - 5. Cianobacterias. Positivo-negativo
  - 6. Presencia combinada: únicamente las clasificadas como presencia positiva en alguna de ellas.

- *Legionella* spp – *Pseudomonas* spp
  - *Legionella* spp – *Mycobacterium* spp
  - *Mycobacterium* spp - *Pseudomonas* spp
  - No se combina
- *Termotolerancia*. La temperatura óptima para el desarrollo de las AVL se encuentra entre los 22-30 °C. Se crearon dos variables para el registro independiente a 37°C, 42 °C. La valoración de la tolerancia de las AVL a ambas temperaturas, se realizó por observación con microscopio óptico. Considerando el aumento de 5mm. del halo inicial del inóculo, como crecimiento positivo y si no se observó ningún cambio, crecimiento negativo, una vez transcurrida una semana.
  - *Osmotolerancia*: el manitol a altas concentraciones, se considera un medio tóxico para las AVL. Se comprobó la tolerancia a concentraciones de 0,3 M, 0,5 M, 1M, creando tres variables y registrando como tolerancia positiva el crecimiento de 5 mm. a partir del halo inicial de la gota del inóculo y si no se observaba ningún cambio, crecimiento negativo, una vez transcurrida una semana.

Los datos se recogieron mediante el programa Microsoft Office Excel 2010© y fueron exportados a una matriz con formato propio del programa Statistical Package for the Social Sciences© (SPSS), para entorno Windows©, en su versión 19.0.

En el análisis univariante, se tuvo en cuenta la escala de medida de cada variable y así, en las variables de tipo nominal u ordinal, en el análisis numérico, se realizaron las correspondientes distribuciones de frecuencias.

En los análisis bivariantes, también se tuvieron en cuenta la escala de medida de las variables implicadas. Si las variables eran de tipo cualitativo, se emplearon tablas de contingencia y, en el análisis de la significación de la relación entre ambas se empleó la prueba Chi-cuadrado. Cuando una de las variables era dicotómica y la otra cuantitativa, se comprobó la normalidad. Si seguía la distribución normal, se realizó la Prueba T o el Análisis de varianza; y si no, se utilizó la prueba de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

## **IV. RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

---

### A- RESULTADOS AGUAS DE RED

Las muestras estudiadas fueron recogidas durante los años 2008, 2009, 2010, alcanzando un total de 1298. Sus procedencias incluyen fuentes ornamentales situadas en parques y zonas de recreo, spas, aljibes, playas recreativas fluviales y fuentes de la zona expo-Zaragoza 2008, agua de red para servicios públicos, agua corriente de domicilios particulares, torres de refrigeración, puntos superficiales y agua caliente sanitaria.

El análisis de los resultados sigue el esquema:



## 1. MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS PARA AVL

Los resultados obtenidos en el cultivo de AVL se muestran en el Gráfico 1, y su distribución según la procedencia en la Tabla 1. Se observa que el porcentaje de negativos en aguas de red [80%; 1037/1298] fue mucho más elevado que el de los positivos [20%; 261/1298].



Gráfico 1. Distribución de AVL positivas y negativas sobre el total de muestras

Frec %	Fuentes	spa	aljibes	Playas recreativas	Agua de red pública	Agua de red privada	Torres refrigeración	Puntos sup.	Agua caliente sanitaria	total
<b>positivas</b>	116	3	3	14	34	20	4	11	56	261
	(25,8)	(14,3)	(20)	(100)	(91,1)	(6,1)	(16)	(47,8)	(14,6)	(20)
<b>negativas</b>	333	18	12	0	3	310	21	12	328	1037
	(74,2)	(84,7)	(88)	(0)	(97)	(93,9)	(84)	(88)	(84,4)	(80)
<b>Total</b>	449	21	15	14	37	330	25	23	384	1298

Tabla 1. Clasificación de las muestras positivas y negativas, según su procedencia. Se muestra el número de casos y entre paréntesis el porcentaje para cada categoría.

Los puntos donde se obtuvieron mayor proporción de casos positivos en relación al número de muestras recogidas en cada lugar de origen fueron “las playas fluviales” 100% (14/14), el “agua de red para servicios públicos” 91,1% (34/37), los “puntos superficiales” 47,8% (11/23), seguido por las fuentes ornamentales 25,8% (116/449). La proporción mayor de casos negativos, procedieron de “agua de red privada” 6,1% (20/330), “agua caliente sanitaria” 14,6% (56/384) y “spas” 14,3% (3/21).

La distribución de los puntos de muestreo y número de muestras a lo largo del año, se realiza según la experiencia y resultados obtenidos en controles previos, realizando un mayor control en las épocas de primavera y verano, ya que es cuando se ha valorado que existe un mayor riesgo de producirse aerosoles y emitir microorganismos al aire. Además, es la época del año en la que el uso de las fuentes ornamentales como zonas de baño, es más frecuente. En el año 2008, debido a la celebración en Zaragoza de la Exposición Universal, el control en esos meses de junio, julio y agosto se intensificó principalmente en el recinto de dicha Exposición.



## 2. DISTRIBUCIÓN DE AVL SEGÚN GÉNERO

De las 261 cepas positivas obtenidas por cultivo, 63 fueron positivas por PCR y de ellas se pudieron identificar 44 (16,9%). Al tratarse de muestras ambientales se encontraron frecuentemente contaminadas con otros microorganismos, lo que dificultó la amplificación y genotipado de las cepas.

En la Tabla 2 se muestran los géneros identificados:

<i>Característica</i>	<i>Frec. (%)</i>
<i>AVL de agua de red</i>	
<i>Acanthamoeba</i>	13 (29,5)
<i>Hartmannella</i>	17 (38,6)
<i>Paravahlkamfia</i>	1 (2,3)
Otras amebas	13 (29,6)
Total	44 (100,0)

Tabla 2. Frecuencia de AVL según géneros y proporción sobre el total.

Entre los géneros previamente descritos como patógenos, se observa que el género *Hartmannella* (38,6%) supera al de *Acanthamoeba* (29,5%) y ambas a *Paravahlkamfia* (2,3%), de la que únicamente se identificó un caso.

En la Tabla 3 se muestra la distribución de los géneros identificados según su procedencia.

PROCEDENCIA	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>Paravalhkanfia</i>	Otras amebas
<b>Fuentes Ornamentales</b>	6	5	1	6
<b>Agua de uso particular</b>	4	11	-	7
<b>Agua Caliente Sanitaria</b>	1	-	-	-
<b>EDAR</b>	1	-	-	-
<b>Aguas recreativas</b>	1	-	-	-
<b>Total</b>	13	17	1	13

Tabla 3. Frecuencia de los géneros de AVL en cada punto de origen.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el género de AVL y la procedencia de las muestras ( $p > 0.05$ ), aunque sí que se aprecia una mayor tendencia de *Hartmannella* a encontrarse en las aguas de uso particular que en el resto.

Por otra parte, el análisis del fragmento DF3 permitió clasificar las 13 cepas del género *Acanthamoeba* identificadas previamente, en los 18 genotipos identificados hasta el momento. La relación filogenética entre ellas se muestra en la Fig.1.

Nueve cepas se agruparon en el genotipo **T4** con homologías entre ellas de 88,4% a 97,7%, la cepa F-22 aparece en el árbol filogenético en una rama próxima al genotipo **T15** con una homología del 95% y otro aislamiento correspondiente a un EDAR obtuvo un grado de homología del 96% con el genotipo **T11** (Fig. 2). Una cepa no se pudo incluir, al haber amplificado un fragmento no coincidente con las anteriores, aunque sí permitió su identificación.

Del género *Hartmannella*, todas ellas correspondieron a *Hartmannella vermiformis* actualmente denominada *Vermamoeba vermiformis* y el fragmento utilizado no permitió la diferenciación entre cepas.

Se identificaron así mismo 13 (29,6%) cepas consideradas hasta el momento como “no patógenas”, de los géneros, *Rhogostoma schuessleri*, *Allovahlkamfia*, *Filamoeba Cercozoan*, *Amebozoa (Eimeriidae)*, *Echinamoeba exudans* y *Euamoebida*.

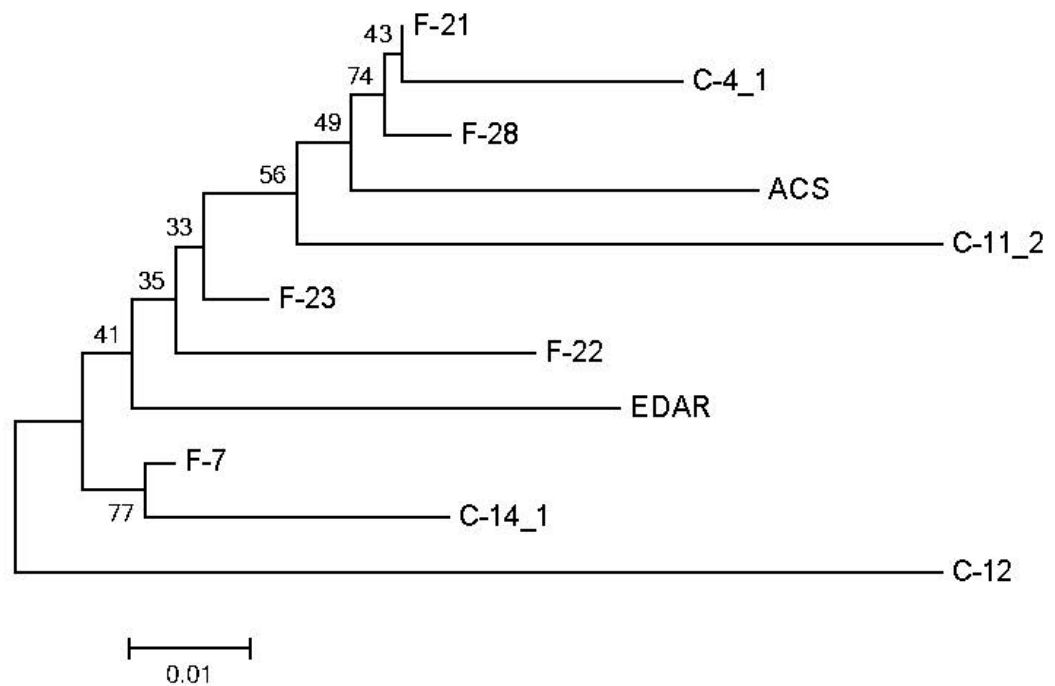


Fig 1. Relación filogenética entre las cepas de *Acanthamoeba* identificadas en el estudio, según la secuencia del fragmento DF3.

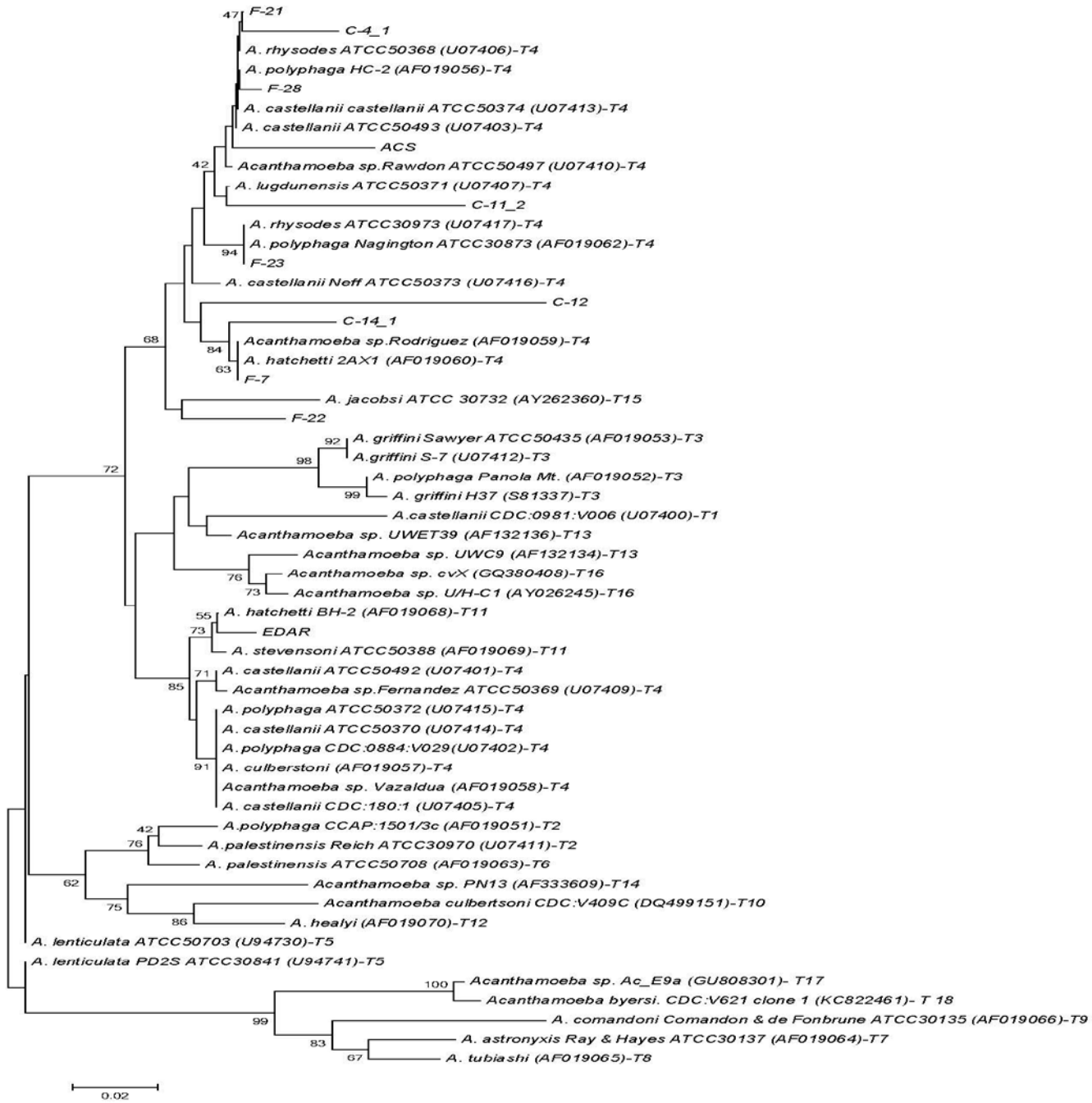


Fig 2. Árbol filogenético de los aislamientos del género *Acanthamoeba* identificados en este estudio según la secuencia del fragmento DF3 y secuencias de los genotipos T1-T18 registradas en el GenBank.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS

#### ENDOSIMBIOTES DE AVL

El análisis de bacterias patógenas en el interior de las AVL identificadas por la técnica de nested-PCR (Calvo, et al. 2012) a partir del ADN de las AVL, proporcionó los siguientes resultados:

Para este análisis, se escogieron al azar 25 cepas de AVL identificadas previamente, resultando 13 positivas y 12 negativas para bacterias patógenas en el interior de AVL. Los resultados por géneros fueron *Pseudomonas* spp. 7 casos y *Mycobacterium* spp. 8 casos (Tabla 4). En dos cepas aparecían combinados ambos géneros. No se identificó en ningún caso *Legionella* spp. ni *Microcystis* spp.

Lo comentado se observa en la Tabla siguiente.

Genero	<i>Pseudomonas</i> spp	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Acanthamoeba</i> spp.*	4	2
<i>Hartmannella</i> spp.	2	1
Otras AVL	1	5
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>8</b>

Tabla 4. Bacterias patógenas intraamebas. Distribución de cepas por géneros

\*En dos de estas cepas el aislamiento fue de ambos géneros

Las AVL en las que se identificaron bacterias patógenas representaron el 52% de las muestras estudiadas (13/25). No fue posible obtener la especie de ninguna de estas bacterias por secuenciación. El 55% de “otras amebas”, el 60% de *Acanthamoeba* y el 42,9% de *Hartmannella* contienen en su interior alguna de las bacterias estudiadas.

Como datos destacados, el 55,6% de “otras amebas” contiene *Mycobacterium* ( $p=0,046$ ) y el 11,1% *Pseudomonas* ( $p>0,05$ ). El 28,6% de las

AVL identificadas como *Hartmannella* contiene *Pseudomonas* y el 14,3% *Mycobacterium* ( $p>0,05$ ). Finalmente, el 20% de *Acanthamoeba* contiene *Mycobacterium* ( $p>0,05$ ) y el 50% *Pseudomonas* ( $p>0,05$ ).

## Resultados

Tabla 5. Relación de muestras de agua de red estudiadas, procedencia, género y genotipo, bacterias

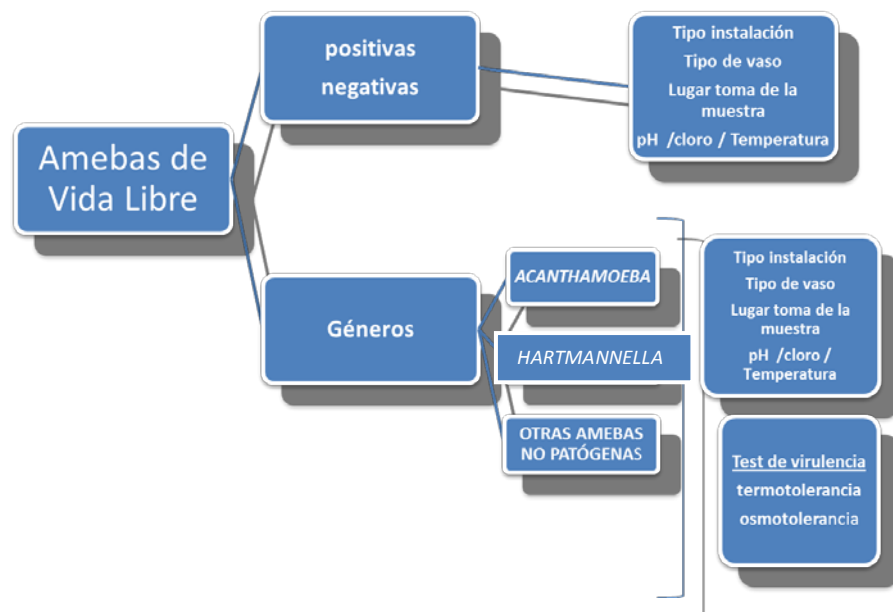
<i>Muestra</i>	<i>Procedencia</i>	<i>AVL Género - genotipo</i>	<i>Microorganismo patógeno</i>
5	Fuente ornamental	<i>Paravahlkamfia spp</i>	Negativo
7	Fuente ornamental	<i>Acanthamoeba</i>	
22	Fuente ornamental	<i>Acanthamoeba (T4)</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
23	Fuente ornamental	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
28	Fuente ornamental	<i>Acanthamoeba castellani</i>	Negativo
47	Fuente ornamental	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
48	Fuente ornamental	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
51	Fuente ornamental	<i>Rhogostoma schuessleri</i>	<i>Pseudomonas spp + Mycobacterium spp</i>
F-12	Fuente ornamental	<i>Allovahlkamfia</i>	
F-20	Fuente ornamental	<i>Euamoebida</i>	<i>Mycobacterium spp</i>
F-21	Fuente ornamental	<i>Acanthamoeba (T4)</i>	<i>Mycobacterium spp</i>
F-22	Fuente ornamental	<i>Amebozoa</i>	
F-20	Fuente ornamental	<i>Euamoebida</i>	<i>Mycobacterium spp</i>
F-28	Fuente ornamental	<i>Acanthamoeba castellani</i>	Negativo
F-32	Fuente ornamental	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Mycobacterium spp</i>
F-40	Fuente ornamental	<i>Filamoeba</i>	
F-47	Fuente ornamental	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
F-72	Fuente ornamental	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
ACS	Agua Caliente Sanitaria	<i>Acanthamoeba (T4)</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
C-1	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Negativo
C-3	Aguas recreativas	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Negativo
C-4.1	Aguas recreativas	<i>Acanthamoeba (T4)</i>	Negativo
C-5	Agua consumo particular	<i>Amebozoa sp.</i>	<i>Mycobacterium spp</i>
C-6	Agua consumo particular (pozo)	<i>Echinamoeba exudans</i>	Negativo
C-9	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Negativo
C-10	Agua consumo particular (pozo)	<i>Amebozoan</i>	Negativo
C-11.1	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Negativo
C-11.2	Agua consumo particular	<i>Acanthamoeba polyphaga (T4)</i>	Negativo
C-7	Agua consumo particular (pozo)	<i>Amebozoa</i>	<i>Mycobacterium spp</i>
C-10.1	Agua consumo particular	<i>Amebozoan</i>	Negativo
C-12	Agua consumo particular	<i>Acanthamoeba polyphaga (T4)</i>	
EDAR	Depuradora de aguas residuales (Zaragoza)	<i>Acanthamoeba (T4)</i>	<i>Pseudomonas spp + Mycobacterium spp</i>
C-19	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-23	Fuente consumo público	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-20	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-21	Agua consumo particular	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	
C-13	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-22	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-24	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-14	Agua consumo particular	<i>Acanthamoeba sp</i>	
C-14.2	Agua consumo particular	<i>Amebozoan</i>	
C-16	Agua consumo particular	<i>Amebozoan</i>	
C-18	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	
C-29	Agua consumo particular	<i>Hartmannella vermiformis</i>	

## B- RESULTADOS AGUAS RECREATIVAS

Se estudiaron 16 centros, de los cuales 6 corresponden a instalaciones cubiertas y 10 son instalaciones al aire libre. Entre todos ellos sumaron un total de 49 vasos, habiendo tomado 2 ó 3 muestras en cada uno, por lo que el total de muestras ascendió a 137.

En la Tabla 6 se muestran los centros junto con los tipos de vasos y el número de muestras tomadas en cada una.

El análisis de los resultados siguió el esquema siguiente;





CENTROS	VASOS				
	competición	recreativa	enseñanza	jacuzzi	hidromasaje.
C1	X (3)	X (3)	X (3)	X (3)	
C2	X (3)	X (3)		X (3)	
C3	X (3)	X (3)	X (3)	X (3)	X (3)
C4	X (3)	X (3)		X (3)	
C5	X (3)	X (3)		X (3)	X (3)
C6		X (3)			
AIRE LIBRE	grande	mediana	pequeña	chapoteo	
C7	X (3)		X (2)		
C8	X (3)		X (2)		
C9	X (3)		X (2)		
C10	X (3)	X (3)	X (3)		
C11	X (3)	X (3)	X (3)	X (2)	
C12	X (3)	X (3)	X (3)		
C13	X (3)		X (3)	X (1)	
C14	X (3)		X (3)	X (2)	
C15	X (3)	X (3)	X (3)	X (1)	
C16	X (3)	X (3)	X (3)		

Tabla 6. Resumen. Centros estudiados. Tipos de vasos. Entre paréntesis aparecen el número de mediciones de cada vaso.

## 1. CULTIVO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN AGAR NO NUTRITIVO

Los resultados obtenidos para los cultivos de AVL en cada una de las 137 muestras se reflejan en la Tabla 7

<i>Característica</i>	<i>Frec. (%)</i>
	<b>MUESTRAS</b>
<b><i>AVL de las piscinas</i></b>	
Positivo	73 (53,3)
Negativo	64 (46,7)
Total MUESTRAS	137 (100,0)

Tabla 7. Frecuencia y Proporción de AVL sobre el total de las muestras

La clasificación en estas categorías se realizó por visión microscópica directa de los cultivos en placas de agar NNA, considerando la presencia de quistes y trofozoítos como resultado positivo.

Se comprobó una proporción muy similar de casos positivos y negativos; siendo ligeramente superior el porcentaje de casos positivos, con una diferencia del 6,6%. Más concretamente, y considerado como “vaso positivo” aquél en la que una de las tres medidas realizadas (superficie, a 30cm. o el biofilm de las paredes) haya sido positiva y “vaso negativo” en las que todas las medidas hayan sido negativas, en el análisis de AVL en cada una de los 49 vasos medidos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 8. En ella se puede comprobar que los vasos positivos fueron una amplia mayoría (83,7%).

<i>Característica</i>	<i>Frec. (%) VASOS</i>
<b>AVL de los vasos</b>	
Positivo	41 (83,7)
Negativo	8 (16,3)
Total	49 (100,0)

Tabla 8. Frecuencia y proporción de AVL positivos y negativos teniendo en cuenta el total de los vasos estudiados

### 1.1. INFLUENCIA DEL TIPO DE INSTALACIÓN EN LA PRESENCIA DE AVL

En la Tabla 9, se muestra la presencia de AVL en función del tipo de instalación categorizando éstas como cubiertas y al aire libre.

<i>AVL en cada tipo de instalación</i>			
<b>Frec. (%)</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total MUESTRAS</b>
<b>Cubierta</b>	45 (75,0%)	15 (25,0%)	60 (100%)
<b>Aire libre</b>	19 (24,7%)	58 (75,3%)	77 (100%)
<b>Total</b>	64 (46,7%)	73 (53,3%)	137 (100%)

Tabla 9. Frecuencia y Proporción de AVL positivas y negativas en instalaciones cubiertas y al aire libre.

Mientras que en las piscinas cubiertas, el 75% dieron negativo para AVL, en las piscinas al aire libre ocurrió lo contrario, habiendo obtenido un 75,3% de cultivos positivos. Se demostró asimismo, una asociación entre el tipo de instalación y la presencia de AVL, siendo significativamente más frecuente en las piscinas al aire libre que en las cubiertas ( $\chi^2 = 34,310$ ;  $p < 0,001$ ). Cuando se consideró el cultivo de AVL en cada uno de los 49 vasos analizados, se observó una asociación estadísticamente significativa entre el

tipo de instalación y la presencia de AVL, que implica una frecuencia mayor en las piscinas al aire libre y por lo tanto implicará mayor presencia de amebas en alguno de los vasos de las piscinas al aire libre. ( $\chi^2 = 8,626$ ;  $p=0,005$ )

Debido a sus diferentes características en general, a partir de este momento, en el trabajo se diferencia por instalaciones:

- A. Cubiertas
- B. Al aire libre

### A. Piscinas cubiertas

El análisis de la presencia de AVL en función del tipo de vaso en las piscinas cubiertas, se muestra en la Tabla 10.

<i>AVL en cada tipo de vaso (piscinas cubiertas)</i>			
Frec. (%)	Negativo	Positivo	Total MUESTRAS
<b>Competición</b>	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)
<b>Recreativa</b>	13 (72,2%)	5 (27,8%)	18 (100%)
<b>Enseñanza</b>	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6 (100%)
<b>Jacuzzi</b>	11 (73,3%)	4 (26,7%)	15 (100%)
<b>Hidromasaje</b>	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)
<b>Total</b>	45 (75,0%)	15 (25,0%)	60 (100%)

Tabla 10. Frecuencia y Proporción de AVL positivas y negativas en los diferentes tipos de vasos de las piscinas cubiertas, sobre el total de las muestras

Al analizar los perfiles de AVL de los tipos de vaso de las piscinas cubiertas, se comprobó que en “enseñanza” había un perfil ligeramente diferente al resto, ya que en la mayoría de los vasos, el cultivo negativo supera el 72%, mientras que en “enseñanza” se reparten por igual los casos negativos y positivos. No obstante en el vaso de “competición” es donde el valor de cultivos negativos fue mayor (86,7%) y el de “enseñanza” en el que el cultivo positivo fue mayor (50%). El análisis de la asociación entre el tipo de vaso y la presencia de AVL reflejó la ausencia de diferencias significativas entre ellos ( $\chi^2 = 3,407$ ;  $p = 0,492$ ).

Si consideramos los vasos en que se ha obtenido cultivo positivo para AVL, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

<i>AVL en cada tipo de vaso (piscinas cubiertas)</i>				
Frec. (%)	%positivos	Negativo	Positivo	Total VASOS
<b>Competición</b>	15,4%	3 (60,0%)	2 (40,0%)	5 (100%)
<b>Recreativa</b>	30,8%	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)
<b>Enseñanza</b>	15,4%	0 (0,0%)	2 (100%)	2 (100%)
<b>Jacuzzi</b>	30,8%	1 (20,0%)	4 (80,0%)	5 (100%)
<b>Hidromasaje</b>	7,6%	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100%)
<b>Total</b>	13 100%	7 (35,0%)	13 (65,0%)	20 (100%)

Tabla 11. Frecuencia y Proporción de AVL en los diferentes tipos de vasos de las piscinas cubiertas, sobre el total de las muestras

## B. Piscinas al aire libre

En el caso de las piscinas al aire libre, los resultados obtenidos para cada vaso se muestran en la Tabla 12.

## Resultados

<i>AVL en cada tipo de vaso (piscinas al aire libre)</i>			
Frec. (%)	Negativo	Positivo	Total MUESTRAS
<b>Grande</b>	9 (30,0%)	21 (70,0%)	30 (100%)
<b>Mediana</b>	3 (20,0%)	12 (80,0%)	15 (100%)
<b>Pequeña</b>	6 (23,1%)	20 (76,9%)	26 (100%)
<b>Chapoteo</b>	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100%)
<b>Total</b>	19 (24,7%)	58 (75,3%)	77 (100%)

Tabla 12. Frecuencia y Proporción de AVL en los diferentes tipos de vasos de las piscinas al aire libre, sobre el total de las muestras.

En todos los casos, el porcentaje mayoritario correspondió al cultivo positivo, con un mínimo del 70%. En las piscinas de “chapoteo” es donde se obtuvo un mayor porcentaje (83,3%) y en las piscinas “grandes” en las que dicho porcentaje es menor (70%). En este caso la prueba de Chi-cuadrado lleva a afirmar con un nivel de confianza del 95%, que no hay diferencias significativas entre los perfiles de AVL de los distintos vasos de las piscinas al aire libre ( $\chi^2 = 0,877$ ;  $p=0,831$ ). Considerando los tipos de vasos de cada instalación, los resultados (Tabla 13) reflejan la alta proporción de vasos positivos.

<i>AVL en cada tipo de vaso (piscinas al aire libre)</i>				
Frec. (%)	%positivos	Negativo	Positivo	Total VASOS
<b>Grande</b>	32,1%	1 (10,0%)	<b>9 (90,0%)</b>	10 (100%)
<b>Mediana</b>	17,9%	0 (0,0%)	<b>5 (100%)</b>	5 (100%)
<b>Pequeña</b>	35,7%	0 (0,0%)	<b>10 (100%)</b>	10 (100%)
<b>Chapoteo</b>	14,3%	0 (0,0%)	<b>4 (100%)</b>	4 (100%)
<b>Total</b>	100%	1 (3,4%)	<b>28 (96,6%)</b>	29 (100%)

Tabla 13. Distribución y proporción de AVL según el tipo de vaso en piscinas al aire libre sobre el total de los vasos

## 1.2 INFLUENCIA DEL LUGAR DE LA TOMA DE LA MUESTRA

Los valores obtenidos para el cultivo de AVL en función del lugar de la toma de la muestra se describen en la Tabla 14.

<i>AVL en cada lugar de toma de la muestra Frec. (%)</i>			
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total MUESTRAS</b>
<b>Superficie</b>	17 (34,7%)	32 (65,3%)	49 (100%)
<b>A 30 cm.</b>	19 (46,3%)	22 (53,7%)	41 (100%)
<b>Hisopoparedes</b> <b>Biofilm paredes</b>	28 (59,6%)	19 (40,4%)	47 (100%)
<b>Total</b>	64 (46,7%)	73 (53,3%)	137 (100%)

Tabla 14. Frecuencia y Proporción de AVL según el lugar de la toma de la muestra, sobre el total de las muestras

Al analizar los perfiles de AVL de los lugares de toma de la muestra, se comprobó una mayor proporción de cultivos positivos (65,3%) cuando la muestra se tomó en la superficie que cuando la toma se realizó a 30 cm de profundidad o del biofilm de las paredes ( $\chi^2 = 6,029$  y una  $p = 0,049$ ), siendo en estos dos últimos muy similar.

## 1.3. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Las características físico-químicas que se tuvieron en cuenta fueron: el pH, el contenido en cloro residual, y en el caso de las piscinas cubiertas, la temperatura del agua.

Para los valores más bajos de **pH del agua**, las proporciones de cultivos positivos y negativos fueron muy similares, no así en el caso de los

valores de pH más altos, donde los cultivos negativos alcanzaron un 83,3%. Sin embargo, no existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de AVL y pH ( $\chi^2 = 4,031$ ;  $p=0,1333$ ). La Tabla 15 muestra los resultados en el cultivo de AVL según el pH del agua.

Respecto al aislamiento de AVL a diferentes concentraciones de **cloro libre** en la piscina, las diferencias obtenidas no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2= 5,328$ ,  $p= 0,070$ ), aunque sí que se apreció una tendencia a aumentar la presencia, cuando los niveles de cloro descendieron, con un 71,4% de positivos en los valores más bajos frente a un 38,2% en los más altos.

Las variaciones en el cultivo de AVL según **la temperatura del agua**, sólo se consideraron en las piscinas cubiertas, como ya se mencionó en el apartado de metodología. Para analizar la posible relación entre la temperatura del agua de la piscina y AVL, dado que la primera de las variables es cuantitativa, se compararon las temperaturas medias de los casos en los que se demostró presencia de AVL, con las de los casos en que el cultivo había sido negativo. Se comprobó que la temperatura media era muy similar en los dos grupos y que, en ambos casos, estaba próxima a 29,6 grados; siendo ligeramente superior (tan sólo en 0,15 grados) la del grupo de AVL positivo, no habiendo encontrado relación significativa entre este parámetro y la presencia de amebas (Mann-Whitney 0,734) (Tabla 15).



## Resultados

<i>AVL según el pH de la piscina</i>				
Frec. (%)		Negativo	Positivo	Total MUESTRAS
7,1 o menos		16 (50,0%)	16 (50,0%)	32 (100%)
De 7,2 a 7,6		43 (43,4%)	56 (56,6%)	99 (100%)
7,7 o más		5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)
<b>Total</b>		64 (46,7%)	73 (53,3%)	137 (100%)
<i>AVL según el cloro de la piscina</i>				
Frec. (%)		Negativo	Positivo	Total MUESTRAS
≤ 0,59 mg/l		4 (28,6%)	10 (71,4%)	14 (100%)
De 0,6 a 2,0 mg/l		39 (43,8%)	50 (56,2%)	89 (100%)
≥ 2,10 mg/l		21 (61,8%)	13 (38,2%)	34 (100%)
<b>Total</b>		64 (46,7%)	73 (53,3%)	137 (100%)
<i>Temperatura - AVL</i>				
AVL	N	Media	Desv. típica	Estadístico (significación)
Negativo	45	29,56	2,67	-0,340 (0,734)
Positivo	15	29,71	2,54	

Tabla 15. Variaciones de los valores de pH, cloro libre y temperatura (sólo piscinas cubiertas) y la proporción de cultivos positivos y negativos de AVL. Se han tenido en cuenta las 137 muestras totales.

Por otra parte, el análisis de la influencia de los parámetros físico-químicos según el tipo de vasos, no resultó adecuado por el bajo número de muestras existentes para cada tipo de vaso.

## 2. PROPORCIÓN DE AVL SEGÚN GÉNEROS

La identificación de las AVL detectadas mediante cultivo fue posible en 74 casos (54%). Los géneros identificados se pueden observar en la Tabla 16:

<i>Característica</i>	<i>Frec. (%)</i>
<b><i>AVL de las piscinas</i></b>	
<i>Acanthamoeba</i>	21 (28,4)
<i>Hartmannella</i>	23 (31,1)
Otras amebas	30 (40,5)
Total	74* (100,0)

Tabla 16. Frecuencia y proporción de géneros de AVL sobre el total de las muestras positivas

\*La variación de las muestras positivas (de 73 a 74) se debe a que al realizar el análisis por géneros amplificaron para una misma muestra dos amebas de diferente género utilizando PCRs diferentes.

La denominación “Otras amebas” hace referencia a aquellas amebas de vida libre identificadas por cultivo, según criterios morfológicos o mediante técnicas moleculares, que no respondieron a los géneros *Acanthamoeba* o *Hartmannella*, y que por el momento no han sido descritas como patógenas. El género *Naegleria* fue estudiado para todos los vasos y todos los casos resultaron negativos.

Entre los géneros potencialmente patógenos identificados, la proporción del género *Hartmannella* (31,1%) fue ligeramente superior al de *Acanthamoeba* (28,4%) y al considerar las AVL potencialmente patógenas en su totalidad, agrupando *Acanthamoeba* y *Hartmannella* (59,5%), este grupo superó considerablemente al de “otras amebas” (40,5%) (Tabla 16).

Seguidamente se analiza la distribución de los géneros identificados en función de las características de las instalaciones.

## 2.1 TIPO DE INSTALACIÓN

La distribución de las amebas identificadas según el tipo de instalación, se observa en la Tabla 17.

<i>Género de AVL en cada tipo de instalación</i>				
<b>Frec. (%)</b>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Hartmannella</i>	<b>Otras</b>	<b>Total</b>
<b>Cubierta</b>	2 (13,3))	7 (46,7)	6 (40)	15 (100)
<b>Aire libre</b>	19 (31,7)	16 (26,7)	24 (41,6)	6 (100)
<b>Total</b>	21 (28)	23 (30,3)	30 (42,1)	74 (100)

Tabla 17. Frecuencia y Proporción de géneros de amebas AVL en cada tipo de instalación

Mientras que en las piscinas cubiertas *Hartmannella* (46,7%) fue el género predominante, en las piscinas al aire libre “Otras” amebas fueron mayoritarias (41,6%). La proporción del género *Acanthamoeba* fue mayor en las piscinas al aire libre que en las cubiertas. Realizada la prueba Chi-cuadrado se ha obtenido un valor del estadístico de 1,816 y una significación del mismo de 0,4031 que, llevan a afirmar, con un nivel de confianza del 95%, que el género de AVL identificado no difirió significativamente entre las piscinas al aire libre y las piscinas cubiertas. (Tabla 17).

Si se analizan las amebas potencialmente patógenas de forma conjunta, lo que implica agrupar *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, se obtuvo una proporción mayor con respecto al total de las muestras (56,8%) que el de “otras amebas” (40,5%), en los dos tipos de instalación. Tabla 18.

<b>AVL potencialmente patógenas en cada tipo de instalación</b>			
	<b>AVL potencialmente patógenas</b>	<b>AVL potencialmente no patógenas</b>	<b>Total</b>
<b>Cubiertas</b>	9	6	15
<b>Aire libre</b>	35	24	59
<b>Total</b>	44 (59,5%)	30 40,5%	74 100%

Tabla 18. Frecuencia y proporción de AVL según el tipo de instalación, considerando *Acanthamoeba* y *Hartmannella* en la categoría "AVL potencialmente patógenas" y las "otras amebas", como "AVL potencialmente no patógenas".

## 2.2 TIPO DE VASO Y CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA

En este apartado se consideran los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* en una misma categoría, considerándolas como patógenos potenciales y la categoría otras amebas, como potencialmente no patógenas.

En este caso se analizaron los vasos de cada tipo de instalación por separado.

## A. Piscinas cubiertas

Los resultados que se obtuvieron al analizar el género de AVL según el tipo de vaso en las piscinas cubiertas se muestra en la Tabla 19:

<i>Géneros patógenos y no patógenos según tipo de vaso (piscinas cubiertas)</i>			<i>AVL positivos</i>
	<i>Acanthamoeba Hartmannella</i>	Otras amebas	Patógenas / total de muestras Frec/ %
<b>Competición</b>	1	1	1/15 6,7%
<b>Recreativa</b>	4	1	4/18 22,2%
<b>Enseñanza</b>	1	1	1/6 16,7%
<b>Jacuzzi</b>	2	2	2/15 13,3%
<b>Hidromasaje</b>	1	0	1/6 16,7%
<b>Total MUESTRAS</b>	9	6	9/60 15%

Tabla 19. Frecuencia y proporción de "AVL potencialmente patógenas y no patógenas" en relación al total de muestras según el tipo de vaso en piscinas cubiertas

Dado el pequeño número de casos (15), lo que supuso disponer de poca información, no se consideró adecuado realizar un análisis de relación entre las dos variables. Sin embargo, se observó que era en las piscinas recreativas donde existía una frecuencia mayor de AVL potencialmente patógena (22,2%). Las amebas potencialmente patógenas en las piscinas cubiertas supusieron un 15% del total de las muestras estudiadas en dicha instalación. Tabla 19.

## B. Piscinas al aire libre

<i>Tipo de vaso</i>	<i>Géneros patógenos y no patógenos en cada tipo de vaso (piscinas al aire libre)</i>		
<i>Frec. (%)</i>	<i>Acanthamoeba Hartmannella</i>	<i>Otras amebas</i>	<i>total</i>
<b>Grande</b>	10 (29,4%)	11	21
<b>Mediana</b>	8 (23,5%)	3	11
<b>Pequeña</b>	11 (32,4%)	10	21
<b>Chapoteo</b>	5 (14,7%)	0	5
<b>Total</b>	34	24	58

Tabla 20. Frecuencia y proporción de “AVL potencialmente patógenas y no patógenas” en relación al total de muestras según el tipo de vaso en piscinas cubiertas

En las piscinas al aire libre, se observó presencia de *Acanthamoeba* o *Hartmannella* en todos los tipos de vasos, aunque fue en la categoría “pequeña” en la que se obtuvo el valor más alto (32,4%) y en la de chapoteo la proporción menor (14,7%).Tabla 20.

Si en los vasos consideramos el **lugar de la toma de la muestra**, a 30 cm. de profundidad se aislaron un mayoritario 77,3% de amebas potencialmente patógenas (*Acanthamoeba* y *Hartmannella*), mientras que en el biofilm recogido de las paredes destacó el aislamiento de AVL incluidas en la categoría “Otras AVL” (57,9%), no encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre el lugar de la toma de la muestra y la presencia o no de amebas potencialmente patógenas. Tabla 21.

En el análisis del **pH del agua** y su relación con el perfil de género de las amebas potencialmente patógenas, se prescindió del único caso con pH de “7,7 o más”, para poder estudiar mejor la posible relación de las dos variables. Mientras a niveles óptimos de pH (7,2-7,6) la supervivencia de ambos tipos de amebas fue similar, a pH por debajo de 7,2, existe una mayor

población de amebas potencialmente patógenas, de forma que los géneros potencialmente patógenos se encontraron asociados a pH bajo y Otras amebas a un pH un poco más alto ( $\chi^2 = 12,981$ ,  $p = 0,0021$ ).

Por otra parte, se observó que los géneros potencialmente patógenos *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, no se vieron afectados por los niveles de cloro libre en la piscina, ya que se obtuvieron valores muy similares por encima y por debajo de 2,10 mgr/l (67,3% y 69,2% respectivamente). Sin embargo, para otras amebas, cuando aumentaron los valores de cloro  $\geq 2,10$  mg/l la proporción descendió del 53% al 38,8%. Tabla 21.

En cuanto a la relación entre la **temperatura del agua** y el género de AVL en las piscinas cubiertas, debido a los valores tan similares de la temperatura media, no se realizó el análisis ya que se reducen las posibilidades de obtener resultados significativos.

<b>Géneros patógenos y no patógenos según el lugar de la toma de la muestra</b>			
	<b><i>Acanthamoeba Hartmannella</i></b>	<b>Otras amebas</b>	<b>Total</b>
<b>Superficie</b>	19 (57,6%)	14 (42,4%)	33 (100%)
<b>A 30 cm.</b>	17 (77,3%)	5 (22,7%)	22 (100%)
<b>Hisopoparedes "biofilm"</b>	8 (42,1%)	11 (57,9%)	19 (100%)
<b>Total</b>	44	30	74
<b>Géneros patógenos y no patógenos según características físico-químicas</b>			
<b>pH del agua</b>	<b><i>Acanthamoeba Hartmannella</i></b>	<b>Otras amebas</b>	<b>Total</b>
<b>7,1 o menos</b>	13 (81,3%)	3 (18,8%)	16 (100%)
<b>De 7,2 a 7,6</b>	28 (50,9%)	27 (49,1%)	55 (100%)
<b>Total</b>	41 (57,7%)	30 (42,3%)	71 (100%)
<b>Cloro libre</b>	<b><i>Acanthamoeba Hartmannella</i></b>	<b>Otras amebas</b>	<b>Total</b>
<b>&lt; 2,10 mg/l</b>	33 (67,3%)	26 (53%)	49 (100%)
<b>≥ 2,10 mg/l</b>	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13 (100%)
<b>Total</b>	42	30	72

Tabla21. Frecuencia y distribución de AVL potencialmente patógenas y no patógenas según el lugar de la toma de muestra y variaciones de los valores de pH, cloro libre, teniendo en cuenta el total de los cultivos positivos.



MUESTRA	GENERO/GENOTIPO	CENTRO
P1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C1
P2	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C1
P3	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C1
P4	<i>Flamella arnhemensis</i>	C1
P5	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C1
P6	Ameba no identificada	C2
P7	Ameba no identificada	C2
P8	<i>Acanthamoeba</i> genotipo T4	C2
P9	Ameba no identificada	C2
P11	<i>Telaepolella tubasferens</i>	C3
P12	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C4
P14	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C4
P15	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C5
P16	<i>Flamella</i>	C5
P18	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C5
P26	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C7
P28	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C7
P29	<i>Protacanthamoeba bohemica</i>	C7
P30	Ameba no identificada	C7
P31	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C8
P32	Ameba no identificada	C8
P33	<i>Filamoeba</i>	C8
P34	Ameba no identificada	C8
P35	Ameba no identificada	C8
P36	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C8
P37	<i>Acanthamoeba</i> T4	C8
P38	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C8
P39	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C8
P41	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C9
P42	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C9
P43	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C9
P44	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C9
P45	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C9
P46	<i>Acanthamoeba</i> sp	C10
P47	<i>Acanthamoeba</i> T4	C10
P48	Ameba no identificada	C11
P49	Ameba no identificada	C11
P50	Ameba no identificada	C11
P51	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C10
P52	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C10
P53	Ameba no identificada	C10
P54	Ameba no identificada	C11
P55	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C11
P56	Ameba no identificada	C12
P57	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C12

MUESTRA	GENERO/GENOTIPO	CENTRO
P58	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C12
P59	Ameba no identificada	C12
P60	Ameba no identificada	C13
P61	<i>Protacanthamoeba bohemica</i>	C13
P62	Ameba no identificada	C13
P63	Ameba no identificada	C13
P64	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C14
P65	<i>Apusomonas proboscidea</i>	C14
P66	<i>Vahlkampfia avara</i>	C14
P67	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C14
P68	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C14
P69	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C15
P70	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C15
P72	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C15
P73	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C15
P74	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C15
P75	Ameba no identificada	C16
P76	Ameba no identificada	C16
P77	Ameba no identificada	C16
P78	Ameba no identificada	C16
P79	<i>Acanthamoeba</i> T4 <i>Hartmannella vermiformis</i>	C16
P80	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C16
P81	<i>Hartmannella vermiformis</i>	C16
P82	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C16
P83	Ameba no identificada	C16
P84	<i>Acanthamoeba castellani</i>	C16
P85	<i>Acanthamoeba</i> sp.	C16
P89	<i>Acanthamoeba</i> T4/4	C16

Tabal 22. Relación de muestras de piscinas cubiertas y al aire libre, género y genotipo de AVL identificadas por PCR (Ameba no identificada hace referencia a otras amebas identificadas morfológicamente pero no por PCR) y centro municipal al que corresponden.

### **3. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS DEL GÉNERO *ACANTHAMOEBA***

El alineamiento y posterior análisis de las secuencias obtenidas de los productos de PCR, así como su estudio filogenético ha permitido obtener algunas observaciones, que se detallan a continuación. En la figura 3 se muestra el árbol filogenético obtenido para las cepas aisladas de piscinas y las cepas de referencia utilizadas en el estudio.

La cepa P42J se sitúa en el grupo de las amebas con genotipos T7/T8/T9/T17/ y T18, con homologías que oscilan entre el 93% y un 95% con el genotipo T9. Obsérvese que la cepa P42F, procedente de la misma piscina se agrupa con las cepas del cluster que contiene el genotipo T4 y presenta con la anterior una homología tan solo del 85%. Esta cepa presenta a la vez un 99,5% de homología con la cepa P36F, muy alejada geográficamente de la anterior.

Destacamos, por haber sido incluida en otro experimento, que la cepa P31F alcanza una identidad del 100% con las cepas genotipo T4 *A. polyphaga* ATCC 50493 y CDC 0884 V029 y *A. castellani* ATCC 50370. También presenta una homología del 100% con las cepas P47F, P47J y P79, todas ellas muy alejadas geográficamente y con la P37J perteneciente al mismo centro.

La mayoría de las cepas pertenecen al genotipo T4. Después hay 3 cepas bastante diferenciadas: la P8J resulta en grupo aparte debido a la baja longitud de la secuencia obtenida que impide su adecuada comparación. Las cepas P43J y P43F presentan homologías que no superan el 90%, ni con las cepas de referencia ni con el resto de las piscinas.

## Resultados

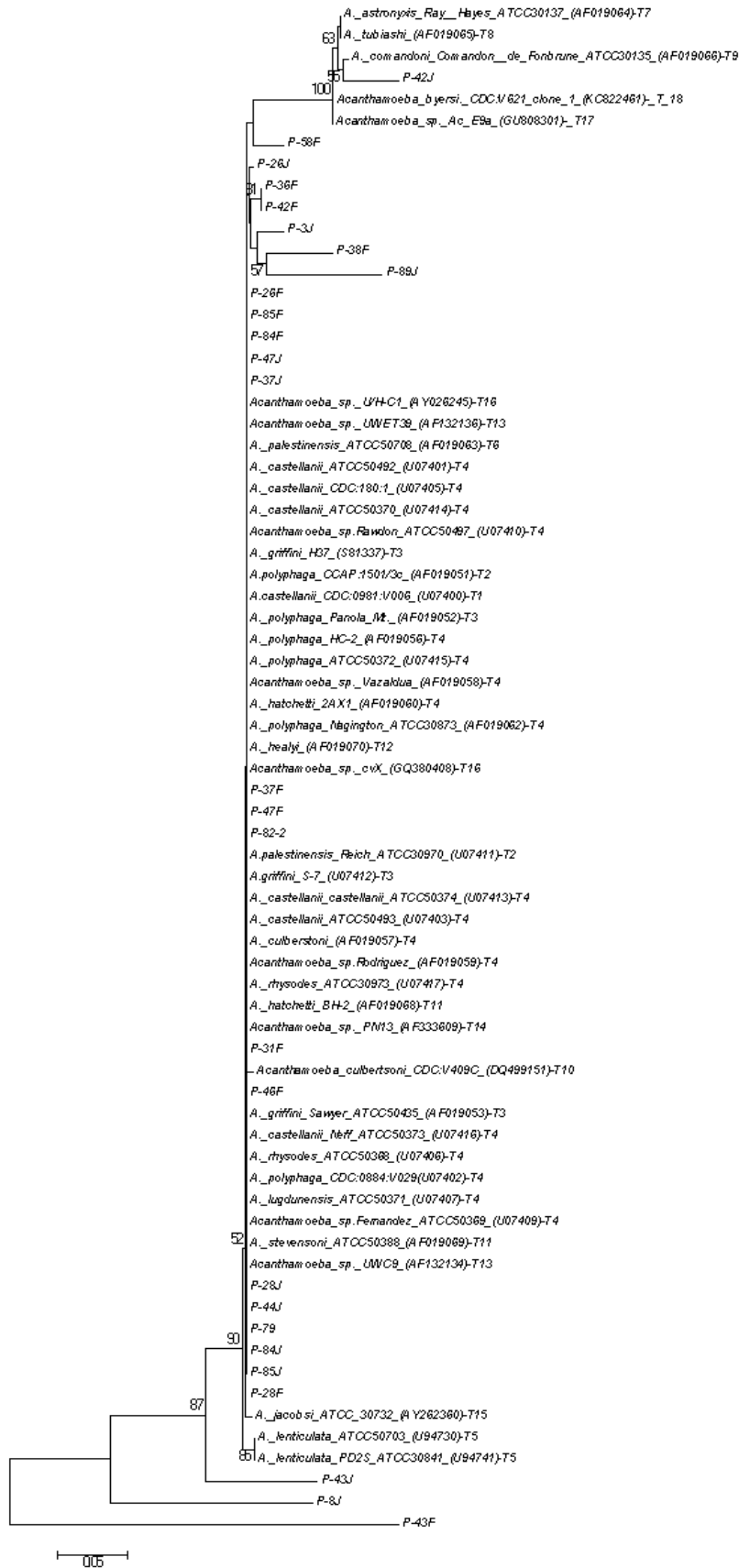


Fig. 3. Estudio filogenético de *Acanthamoeba* aisladas de piscinas con las cepas de referencia utilizadas en el estudio

## 4. VIRULENCIA DE LAS AMEBAS POTENCIALMENTE PATÓGENAS DE PISCINAS

### 4.1. TERMOTOLERANCIA

Para el estudio de la termotolerancia como factor de virulencia en las AVL, se tomaron 9 muestras del género *Acanthamoeba* y 4 de *Hartmannella* al azar; entre las del género *Acanthamoeba*, 7 corresponden a piscinas al aire libre y 2 piscinas cubiertas, mientras que las del género *Hartmannella* procedían todas de piscinas cubiertas. Los ensayos de tolerancia a la temperatura no se encuentran descritos para *Hartmannella*, pero se decidió incluir este género precisamente por la no existencia de datos al respecto. Las cepas estudiadas fueron: P3, P5, P8, P12, P14 y P15 procedentes de piscinas cubiertas; P28, P31, P37, P43, P46, P79 y P84 procedentes de las piscinas al aire libre

En todas ellas se observó la misma tendencia, con crecimiento a 37°C, tanto de los trofozoítos como de los quistes; a 42°C no se producía ningún crecimiento del halo del inóculo inicial a las 72 hs. en las cepas de ambos géneros. Tras la incubación a 42°C, esa misma placa fue incubada a 37°C otras 72hs., observándose crecimiento posterior, entre moderado y abundante en todas las del género *Acanthamoeba* salvo en una (P79) en la que los quistes se observaron desnaturalizados. Las cepas del género *Hartmannella* no aumentaron ni el número de quistes ni de trofozoítos. No se observaron diferencias de comportamiento con las variaciones de temperatura, de las AVL procedentes de piscinas cubiertas y al aire libre del género *Acanthamoeba*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 23.

## Resultados

<i>Muestra/ tipo de instalación</i>	<i>37°C 72 hs.</i>	<i>42°C 72hs</i>	<i>De 42°C a 30°C 72 hs</i>	<i>Género</i>
<b>P3 cubierta</b>	+ t ++q	++q -	+++t +++q	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P8 cubierta</b>	++t +++q	+q -	+q +t	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P5 cubierta</b>	++t +++q	-	-	<i>Hartmannella</i>
<b>P12 cubierta</b>	++t ++q	+q -	q	<i>Hartmannella</i>
<b>P14 cubierta</b>	+++t +++q	q -	q	<i>Hartmannella</i>
<b>P15 cubierta</b>	+++t +++q	+q -	q	<i>Hartmannella</i>
<b>P28 Aire libre</b>	++t ++q	++q	++t +q	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P37 Aire libre</b>	++t	+q -	+q	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P31 Aire libre</b>	++t ++q	+q -	++t ++q	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P43 Aire libre</b>	+++t +q	++q -	+t +q	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P46 Aire libre</b>	+++t ++q	+q -	++t -q	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P79 Aire libre</b>	++t +q	q desnaturalizados	q desnaturalizados	<i>Acanthamoeba</i>
<b>P84 Aire libre</b>	+++t +++q	++q -	++t ++q	<i>Acanthamoeba</i>

Tabla 23. Variaciones en el crecimiento de quistes y trofozoítos de cepas de *Acanthamoeba* y *Hartmannella* de piscinas cubiertas y al aire libre a las 72hs. del inóculo en cultivo ANN. De 42°C a 37°C: las placas en estufa a 42°C una vez pasadas 72hs. se trasladaron a estufa a 30°C

+ crecimiento moderado ++ crecimiento abundante+++crecimiento en toda la placa  
q/t quistes/trofozoítos

#### 4.2 OSMOTOLERANCIA

El estudio de la tolerancia de las cepas, a distintas concentraciones de manitol, se realizó en 9 cepas de *Acanthamoeba*, que corresponden a 7 de piscinas al aire libre (P28, P31, P37, P43, P46, P79, P84) y 2 de piscinas cubiertas (P3, P8).

Los resultados obtenidos mostraron que a la concentración de 0,3M, todas las cepas crecían en 24-72 hs de forma abundante, muy por encima de los 5mm. de diámetro del inóculo inicial.

A la concentración de manitol de 0,5M el crecimiento que mostraron todas las cepas fue moderado, pero se observaba crecimiento por encima del tamaño del inóculo. Sin embargo, a la concentración mayor utilizada, 1M no se observó crecimiento de ninguna de las cepas a partir del inóculo inicial.

#### 4.3 ENSAYO DE PATOGENICIDAD“IN VIVO”

Se llevó a cabo este experimento para probar la patogenicidad y la capacidad invasiva de dos cepas, una ambiental (P31) procedente de una piscina al aire libre del género *Acanthamoeba* sp. y otra muestra clínica(MC2) del género *Acanthamoeba* procedente de un raspado corneal de un paciente que desarrollo una queratitis y cuya patogenicidad se encontraba por lo tanto demostrada.

Ambas cepas se cultivaron en las condiciones óptimas para su crecimiento (en medio axénico y a una temperatura de 30°C) y fueron inoculadas por el investigador colaborador en este estudio, siguiendo el procedimiento expuesto en el apartado de materiales y métodos. El resultado fue el desarrollo en el animal de experimentación de lesiones en la cornea compatibles con las documentadas por el agente *Acanthamoeba*.

La cepa ambiental, a la semana de realizarse el inóculo, produjo en el ojo un infiltrado corneal, claramente observado con la lámpara de

hendidura. Fig 4. La cepa clínica produjo signos clínicos en la cornea aunque de forma más leve pero también apreciada. Fig 5

Una vez comprobada la patogenicidad de ambas cepas, se realizó un raspado corneal al animal y la muestra obtenida se cultivó en placa en ANN con *E. coli* y se mantuvo incubando a 30°C durante al menos 1 semana y comprobando una vez transcurrido dicho tiempo, el crecimiento en el cultivo de trofozoítos y quistes, tanto de la cepa clínica como de la ambiental, comprobando el papel de *Acanthamoeba* genotipo T4 como agente causal de la queratitis provocada en el animal. Figs. 6 y 7

Con este resultado se demostró la patogenicidad de la cepa ambiental procedente de una piscina al aire libre y la clínica cuya patogenicidad se encontraba demostrada como ya se ha comentado y que por tanto sirvió como control que asegurase el buen funcionamiento del método.



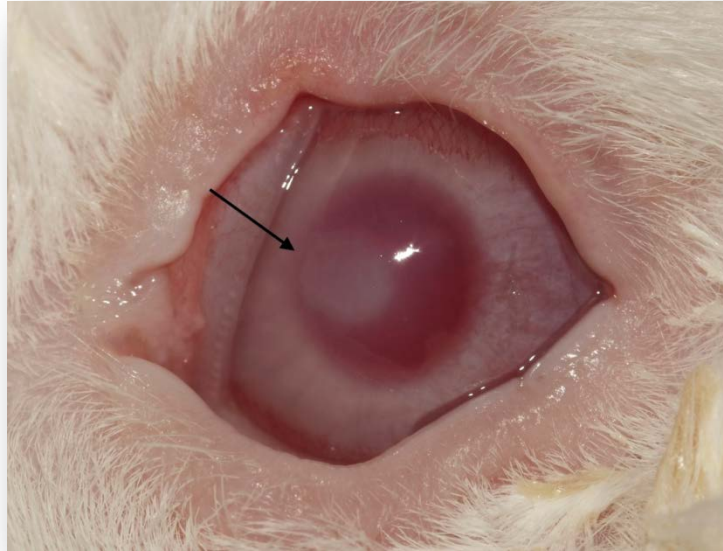


Fig 4. Infiltrado corneal en el ojo del conejo1 de experimentación de la cepa ambiental P31 (piscina al aire libre),tres días después del inóculo.

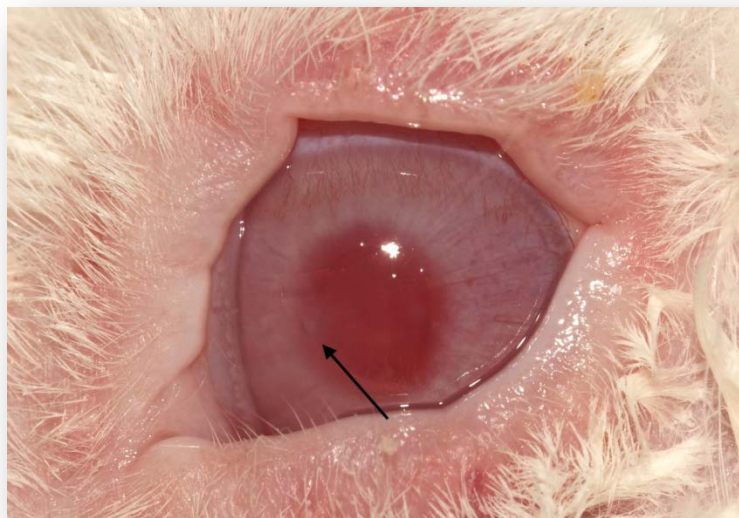


Fig 5. Infiltrado corneal en el ojo del conejo2 de experimentación de la cepa clínica MC2, tres días después del inóculo.

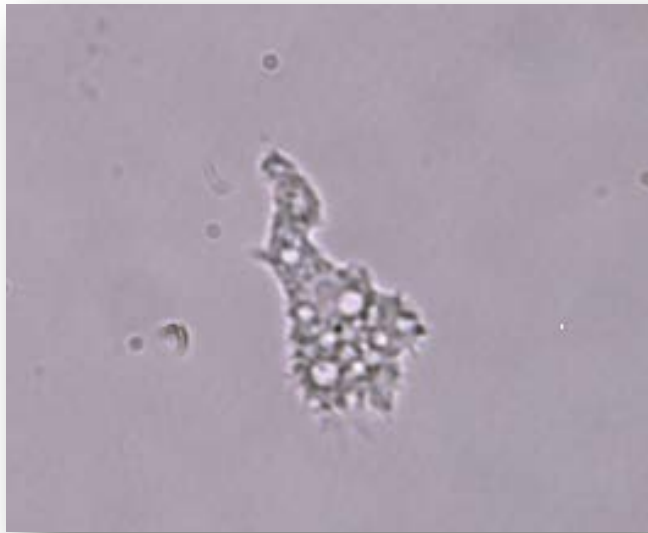


Fig. 6. Imagen al microscopio óptico de un trofozoítos, de una suspensión del cultivo en agar ANN del raspado corneal, procedente del ojo del conejo de experimentación infectado con la cepa ambiental P31.

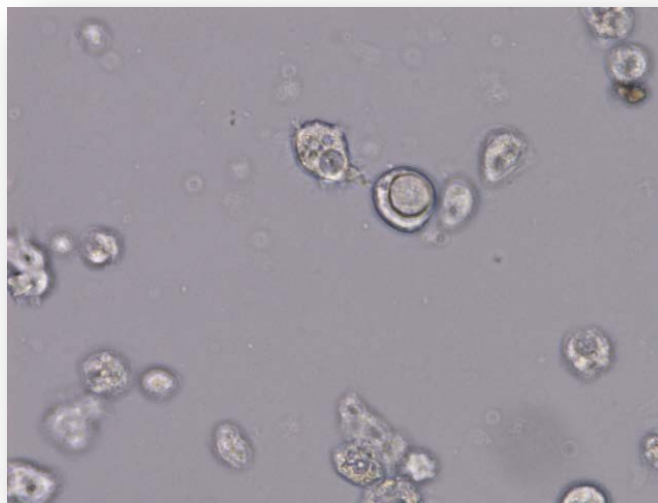
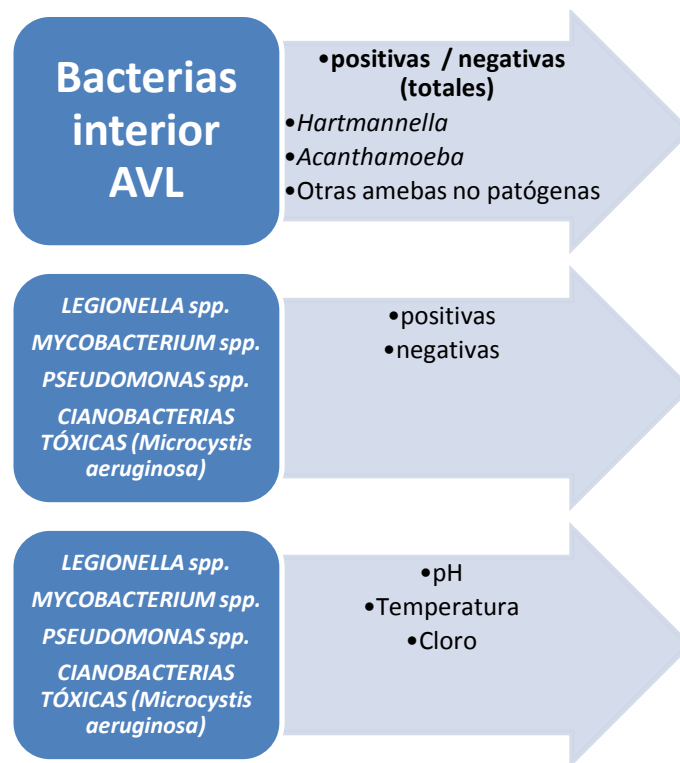


Fig. 7. Imagen al microscopio óptico de trofozoítos y quistes, de una suspensión del cultivo en agar ANN del raspado corneal, procedente del ojo del conejo de experimentación infectado con la cepa clínica MC2.

## 5. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ENDOSIMBIONTES DE LAS AMEBAS CARACTERIZADAS

Para el análisis de los resultados se siguió el esquema siguiente:



La posible presencia de *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y cianobacterias en el interior de las amebas, se investigó en 56 de las muestras que se lograron identificar por PCR. Dichas muestras fueron seleccionadas intentando evitar duplicidades en el mismo vaso y de forma que todas las instalaciones se encontrasen representadas.

En 31 de las 55 muestras de AVL estudiadas (56,4%), se detectó la presencia de alguna de las bacterias investigadas, siendo negativas las 24 restantes (43,6%). Dos muestras resultaron positivas para 2 bacterias simultáneamente.

#### **5.1 RELACIÓN DE LAS BACTERIAS CON EL TIPO DE INSTALACIÓN, TIPO DE VASO Y LUGAR DE LA TOMA DE LA MUESTRA**

Al analizar los perfiles de bacterias de los dos **tipos de instalación**, se comprobó que mientras que en las piscinas cubiertas se distribuyeron por igual, en las piscinas al aire libre había mayoría de resultados “Positivos” (58,1%) siendo la diferencia de porcentajes entre tipos de instalación del 8,1%, y no encontrando una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de bacterias y el tipo de instalación ( $\chi^2 = 0,253$ ;  $p = 0,745$ ).

Al comparar los perfiles de bacterias endosimbiontes en **los tipos de vaso de las piscinas cubiertas**, se comprobó que donde existe un porcentaje mayor de bacterias es en las piscinas “Recreativas”, que representa el 50% del total de los resultados positivos. Cuando se tuvieron en cuenta las muestras estudiadas en cada vaso, las piscinas recreativas obtuvieron un 75% de resultados positivos mientras que los vasos de hidromasaje fueron positivos el 100% (hay que tener en cuenta que únicamente se estudió 1 caso).

Al analizar las bacterias según el **tipo de vaso en las piscinas al aire libre**, se comprobó que sólo en el caso de la piscina “Pequeña” fue menor el porcentaje de resultados Positivos (43,8%) que de Negativos (56,3%), no

encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre presencia de las bacterias endosimbiontes estudiadas y el tipo de vaso ni en las piscinas cubiertas ( $\chi^2=$  de 3,667 ;  $p=$  0,453), ni en las al aire libre ( $\chi^2=$ 2,856;  $p=$  0,4141).

Cuando se estudió la posible asociación entre la presencia de las bacterias estudiadas en el interior de las amebas y los **lugares de toma de la muestra**, se comprobó que conforme descendió la profundidad del lugar de la toma, aumenta el porcentaje de Negativo, aunque se demostró que no había diferencias significativas entre los perfiles de bacterias en función del lugar de la toma de la muestra ( $\chi^2=$  0,666;  $p=$  0,717).\*

Lo comentado se ha reflejado en la Tabla 24.

\*Debido al reducido tamaño de uno de los grupos, no se cumple uno de los requisitos que son necesarios para que sean válidas las conclusiones de la prueba Chi-cuadrado. Por ello, las afirmaciones que se han realizado han de ser tomadas como un indicio o tendencia de lo que se afirmaría en el caso de contar con grupos mayores.

<i>Bacterias en cada tipo de instalación</i>			
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Cubierta</b>	6 (50,0%)	6 (50,0%)	12 (100%)
<b>Aire libre</b>	25 (58,1%)	18 (41,9%)	43 (100%)
<b>Total</b>	31 (56,4%)	24 (43,6%)	55 (100%)
<i>Bacterias en cada tipo de vaso (piscinas cubiertas)</i>			
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Competición</b>	0 (0,0%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>Recreativa</b>	3 (75,0%)	1 (25,0%)	4 (100%)
<b>Enseñanza</b>	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)
<b>Jacuzzi</b>	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)
<b>Hidromasaje</b>	1 (100%)	0 (0,0%)	1 (100%)
<b>Total</b>	6 (50,0%)	6 (50,0%)	12 (100%)
<i>Bacterias en cada tipo de vaso (piscinas al aire libre)</i>			
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Grande</b>	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)
<b>Mediana</b>	7 (77,8%)	2 (22,2%)	9 (100%)
<b>Pequeña</b>	7 (43,8%)	9 (56,3%)	16 (100%)
<b>Chapoteo</b>	3 (60,0%)	2 (40,0%)	5 (100%)
<b>Total</b>	25 (58,1%)	18 (41,9%)	43 (100%)
<i>Bacterias en cada lugar de toma de la muestra</i>			
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Superficie</b>	16 (59,3%)	11 (40,7%)	27 (100%)
<b>A 30 cm.</b>	10 (58,8%)	7 (41,2%)	17 (100%)
<b>Hisopoparedes biofilm</b>	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (100%)
<b>Total</b>	31 (56,4%)	24 (43,6%)	55 (100%)

Tabla 24. Frecuencia y proporción de bacterias en el interior de las amebas según el tipo de vaso en cada una de las instalaciones y el lugar de la toma de la muestra.

## 5.2 RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA

Conforme aumenta el **pH**, tiene lugar una disminución del porcentaje de muestras que contengan como bacterias endosimbiontes las estudiadas. Sin embargo, no se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables ( $\chi^2= 4,758$ ;  $p= 0,0932$ ).

Cuando se consideró el **cloro libre** de la piscina, sí que se comprobaron ciertas diferencias, ya que para niveles de cloro de hasta **2,0 mg/l**, el aumento del cloro de la piscina supuso una disminución del porcentaje de muestras positivas; sin embargo, la tendencia cambió de sentido cuando los niveles de cloro fueron mayores de **2,0 mg/l** (valor del estadístico 1,156;  $p= 0,5613$ ).

Para analizar la posible relación entre la **temperatura del agua** de la piscina y la presencia de bacterias en el interior de las amebas, dado que la primera de las variables es cuantitativa, se compararon las temperaturas medias de los casos en los diferentes grupos de género de AVL. Desafortunadamente, al reducirse el análisis a las piscinas cubiertas, tan sólo se dispuso de 12 casos, lo que impidió la obtención de resultados significativos. No obstante, aunque los grupos eran de reducido tamaño, se comprobó la aparición de una mayor proporción de resultados negativos a una temperatura media inferior a la que se registró el mayor número de casos positivos (con una diferencia de 1,5°C). En la prueba de comparación de medias (prueba T) se obtuvo una significación del estadístico de 0,327 que llevó a afirmar que no hay relación significativa entre la temperatura y la presencia de las bacterias estudiadas.

<sup>1</sup>Lo comentado se observa en la Tabla 25.

---

Debido al reducido tamaño de uno de los grupos, no se cumple uno de los requisitos que son necesarios para que sean válidas las conclusiones de la prueba Chi-cuadrado. Por ello, las afirmaciones que se han realizado han de ser tomadas como un indicio o tendencia de lo que se afirmaría en el caso de contar con grupos mayores.

<i>Bacterias en cada nivel de pH de la piscina</i>				
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>	
<b>7,1 o menos</b>	11 (78,6%)	3 (21,4%)	14 (100%)	
<b>De 7,2 a 7,6</b>	20 (50,0%)	20 (50,0%)	40 (100%)	
<b>7,7 o más</b>	0 (0,0%)	1 (100%)	1 (100%)	
<b>Total</b>	31 (56,4%)	24 (43,6%)	55 (100%)	
<i>Bacterias en cada nivel de cloro de la piscina</i>				
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>	
<b>≤ 0,59 mg/l</b>	7 (70,0%)	3 (30,0%)	10 (100%)	
<b>De 0,6 a 2,0 mg/l</b>	18 (51,4%)	17 (48,6%)	35 (100%)	
<b>≥ 2,10 mg/l</b>	6 (60,0%)	4 (40,0%)	10 (100%)	
<b>Total</b>	31 (56,4%)	24 (43,6%)	55 (100%)	
<i>Temperatura – Bacterias</i>				
<b>Bacterias</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. típica</b>	<b>Estadístico (significación)</b>
<b>Positivo</b>	6	30,3	2,78	1,031 (0,327)
<b>Negativo</b>	6	28,8	1,90	

Tabla 25. Bacterias positivas y negativas en el interior de las amebas y variaciones en los valores de pH, cloro libre y temperatura (piscinas cubiertas)



## 6. GÉNEROS DE BACTERIAS ENDOSIMBIENTES

Para el análisis de la proporción de cada uno de los géneros, se han contabilizado individualmente, los dos casos que resultaron asociados en una misma ameba (2/31) que representa el 6,4% del total. Los géneros que han resultado asociados en dos muestras han sido *Legionella* y *Mycobacterium*.

<i>Géneros bacterias endosimbiontes</i>	
<b>Frec. (%)</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella</i> sp.	16 (48,5%)
<i>Mycobacterium</i> sp	4 (12,1%)
<i>Pseudomonas</i> sp	13 (39,4%)
<b>Cianobacterias</b>	0 (0,0%)
<b>Total</b>	33

Tabla 26. Frecuencia y proporción de bacterias por géneros

El género que se encontró en una mayor proporción en el interior de las amebas fue *Legionella* (48,5%), seguida por *Pseudomonas* (39,4%), por último *Mycobacterium* (12,1%). No encontraron cianobacterias en ningún caso de los estudiados. Tabla 26.

Al analizar la asociación de los géneros de las bacterias endosimbiontes estudiadas y los géneros *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y otras amebas potencialmente no patógenas, se observó tiene un porcentaje de asociación del 56,3% para *Legionella* con *Hartmannella*, del 18,8% con *Acanthamoeba* y 25% con otras amebas no patógenas, resultando una mayor asociación entre *Legionella* y *Hartmannella* que con *Acanthamoeba*. Esta asociación fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 4,271$ ;  $p = 0,039$ ).

*Mycobacterium* sp. apareció en la misma proporción en *Hartmannella* y otras amebas (50%), mientras que no se halló en ningún caso en el interior de *Acanthamoeba*. La asociación entre *Mycobacterium* y los géneros de AVL estudiados no ha resultado ser estadísticamente significativa.

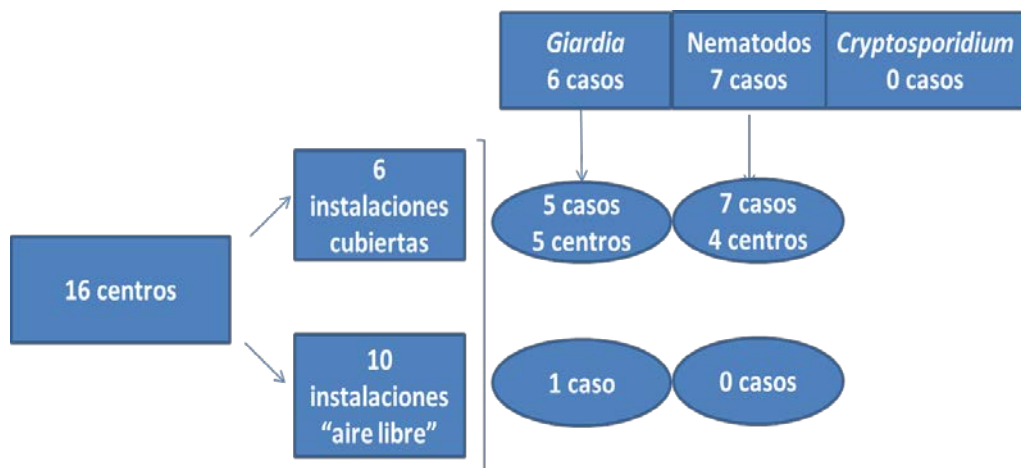
Al analizar los perfiles de *Pseudomonas* en relación con cada género, se comprueba que en *Acanthamoeba* el porcentaje fue del 46,2%, proporción mayor a la encontrada con *Hartmannella* (30,8%), seguido de otras amebas con un porcentaje del 24%. Dicha asociación no resultó estadísticamente significativa.

Tampoco se encontró asociación entre los géneros de las bacterias y el tipo de instalación, tipo de vaso y lugar de la toma de la muestra.

Género de bacterias – Género AVL				
Frec/%	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Hartmannella</i>	Otras amebas	total
<i>Legionella</i> sp.	3 (18,8%)	9 (56,3%)	4(25%)	16(100%)
<i>Mycobacterium</i> sp.	0	2(50%)	2(50%)	4 (100%)
<i>Pseudomonas</i> sp.	6 (46,2%)	4(30,8%)	3(24%)	13(100%)
<b>Total</b>	9	15	9	33

Tabla 27. Frecuencia y proporción de bacterias según el género de AVL que las contienen.

## 7. RESULTADO DEL ESTUDIO DE *GIARDIA DUODENALIS*, *CRYPTOSPORIDIUM* Y NEMATODOS EN AGUAS RECREATIVAS



Se identificó *Giardia duodenalis* en 6 casos, que tras el análisis del genotipo resultó, en todos ellos pertenecen al assemblage genotipo A. Fueron identificados por PCR directamente del agua de cada vaso, no identificando morfológicamente quistes ni trofozoítos. Los vasos correspondían a jacuzzis, vaso de hidromasaje de las piscinas cubiertas y 1 vaso recreativo de las piscinas al aire libre.

El análisis tanto por PCR como morfológico para *Cryptosporidium*, resultó negativo en todos los casos.

Se identificaron 7 casos de **nematodos**, directamente del cultivo utilizado para el crecimiento de AVL en placa de ANN. Amplificaron 6 por PCR para Eukariota descrita por De Long et al 1992, aunque por secuenciación se identificaron 4 de las mismas como: *Trischistoma otaika*, *Tripylina manurewa*, *Aporcelaimellus* sp. *Thornia steatopyga*. Los vasos correspondían a 3 jacuzzis, 2 de hidromasaje, 1 de competición y 1

recreativo, todos ellos de piscinas cubiertas. En uno de los centros, en los tres vasos se identificaron larvas de dichos nematodos. (Tabla 28).

Se observa claramente que el 83,33% de los casos de *Giardia duodenalis* y el 100% de los nematodos, se localizan en las piscinas cubiertas.

El tipo de vaso en el que se identifica con más frecuencia *Giardia*, es en los jacuzzis (50%), mientras que la frecuencia de la distribución de los nematodos en los diferentes tipos de vasos es más variada.

CENTRO	INSTALACIÓN	TIPO DE VASO	GIARDIA DUODENALIS GENOTIPO A	NEMATODOS	AVL
C1	cubierta	jacuzzi	positivo	negativo	<i>Hartmannella</i>
C2	cubierta	jacuzzi	positivo	negativo	negativo
C2	cubierta	recreativo	negativo	positivo	<i>Acanthamoeba</i>
C3	cubierta	jacuzzi	positivo	positivo	Otra AVL no patógena
C4	cubierta	competición	negativo	positivo	negativo
C4	cubierta	recreativo	positivo	positivo	<i>Hartmannella</i>
C4	cubierta	jacuzzi	negativo	positivo	negativo
C5	cubierta	hidromasaje	positivo	positivo	<i>Hartmannella</i>
C10	Aire libre	mediana	positivo	negativo	<i>Hartmannella</i>

Tabla 28. Relación de los centros, tipos de vasos que resultaron positivos para alguno de los microorganismos estudiados y la relación con las AVL.

## **8. RESULTADO DE LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN EL AGUA, POR CULTIVO MICROBIOLÓGICO.**

Para el estudio microbiológico del agua contenida en los vasos de los dos tipos de instalaciones, se tomó una sola muestra de cada vaso, analizando un total de 47 muestras. El cultivo y procesamiento de las muestras fue realizado por el Instituto Municipal de Salud Pública, colaborador junto a la Facultad de Medicina de Zaragoza, en este trabajo.

El análisis de coliformes totales/100ml. (CT) fue negativo en todos los vasos salvo en dos de ellos, aunque con valores prácticamente nulos. Estos vasos corresponden a una piscina “pequeña”(V14P/C13) e “hidromasaje” (P46HS/C6).

Los coliformes fecales/100ml. (CF), fueron negativos en todos los vasos salvo en uno, no cumpliendo con las normas sanitarias aunque con un valor de 1/100ml. Este vaso corresponde con una piscina “pequeña” (V41P/C16) de las instalaciones al aire libre.

No se obtuvo crecimiento de *Streptococcus faecalis* (EF) en ningún vaso, excepto en dos que corresponden a un vaso de “chapoteo” (V10C/C11) y al mismo vaso “piscina pequeña” que resultó positivo para coliformes fecales, ambos de las instalaciones al “aire libre”.

En cuanto al recuento de coliformes fecales, capaces de fermentar la lactosa a 36°/ml., 21 vasos resultaron con valores diferentes de 0, de los cuales sólo 1 superó los máximos permitidos por la normativa (200 ufc/ml). El vaso positivo para este parámetro corresponde a un vaso de “hidromasaje” (P46HS/C6). El hecho que se debe resaltar es, que de las instalaciones cubiertas sólo 3 vasos han resultado positivos y corresponden mayoritariamente a “jacuzzis” (P42JS/C5) “hidromasajes” (P44HS/C3) (P42HS/C3). En algunos centros al aire libre los valores para este parámetro

resultan positivos para todos los vasos que lo forman (C8, C11, C13, C14, C16), sin embargo hay centros donde todos los vasos resultan negativos (C1, C2, C4, C7, C9, C15).

El cultivo de *Pseudomonas (Ps.a/100ml.)*, resultó positivo en un vaso “hidromasaje” (P46HS/C6) con valores 35/100ml., y dos instalaciones al aire libre (V14M y V14P/C13), con valores 1-2/100ml. respectivamente. En el resto el resultado fue negativo.

El análisis por la técnica de PCR de la presencia de *Legionella* en el agua de los vasos, dio un resultado negativo y con la técnica del cultivo en placa los valores son <10ufc/l.

Todos estos resultados se muestran en la Tabla 29.

## Resultados

Centro	Referencia	Recuento 36°/ml	CT /100 ml	CF /100 ml	EF /100 ml	Ps.a. /100 ml	Legionella /PCR	Legionella /litro
<b>C1</b>	P-45-S	0	0	0	0	0	Negativo	
	P-45-R-S	0	0	0	0	0		<10 ufc/l
	P-45-J-S	0	0	0	0	0	Negativo	
<b>C2</b>	P-11-C-S	0	0	0	0	0	Negativo	
	P-11-R-S	0	0	0	0	0		<10 ufc/l
	P-11-E-S	0	0	0	0	0		
	P-11-J-S	0	0	0	0	0	Negativo	
<b>C3</b>	P-44-P-S	0	0	0	0	0	Negativo	
	P-44-H-S	1	0	0	0	0	Negativo	
	P-44-J-S	0	0	0	0	0	Negativo	
<b>C4</b>	P-41-R-S	0	0	0	0	0	Negativo	
<b>C5</b>	P-42-G-S	0	0	0	0	0	Negativo	
	P-42-P-S	2	0	0	0	0	Negativo	
	P-42-J-S	17	0	0	0	0		<10 ufc/l
<b>C6</b>	P-46-G-S	0	0	0	0	0		<10 ufc/l
	P-46-P-S	0	0	0	0	0	Negativo	
	P-46-H-S	51100	<1	0	0	35		<10 ufc/l
	P-46-J-S	0	0	0	0	0	Negativo	

Tabal 29.1 Relación de valores de los parámetros microbiológicos en los vasos de instalaciones cubiertas

## Resultados

Centro	Referencia	Recuento 36°/ml	CT /100 ml	CF /100 ml	EF /100 ml	Ps.a. /100 ml	Legionella /litro
<b>C7</b>	V1G	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V1P	0	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C8</b>	V2G	2	0	0	0	0	<10ufc/l
	V2P	1	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C9</b>	V7G	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V7P	0	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C10</b>	V9G	2	0	0	0	0	<10ufc/l
	V9M	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V9P	0	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C11</b>	V10G	1	0	0	0	0	<10ufc/l
	V10M	1	0	0	0	0	<10ufc/l
	V10P	1	0	0	0	0	<10ufc/l
	V10C	3	0	0	1	0	<10ufc/l
<b>C12</b>	V11P	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V11M	1	0	0	0	0	<10ufc/l
	V11P	2	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C13</b>	V14M	12	0	0	0	2	<10ufc/l
	V14P	10	<1	0	0	1	<10ufc/l
<b>C14</b>	V16G	2	0	0	0	0	<10ufc/l
	V16M	7	0	0	0	0	<10ufc/l
	V16C	7	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C15</b>	V22G	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V22M	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V22P	0	0	0	0	0	<10ufc/l
	V22C	0	0	0	0	0	<10ufc/l
<b>C16</b>	V41G	8	0	0	0	0	<10ufc/l
	V41M	7	0	0	0	0	<10ufc/l
	V41P	34	0	1	19	0	<10ufc/l

Tabla 29.2. Relación de los valores de los parámetros microbiológicos en vasos de instalaciones “aire libre”



### C. MUESTRAS CLÍNICAS

Las cepas clínicas estudiadas MC1, MC2, MC3, MC4 y PALG fueron aisladas del raspado corneal de pacientes con diagnóstico de queratitis y sintomatología clínica, excepto la denominada PALG que procede de un portador asintomático. El dato epidemiológico que nos fue aportado fue que todos los pacientes eran usuarios de lentes de contacto. Todas ellas fueron remitidas por las unidades de oftalmología de hospitales de Zaragoza, para confirmación del diagnóstico de queratitis por *Acanthamoeba*.

Las muestras fueron cultivadas en ANN con *E. coli* inactivada y procesadas como se refiere en el capítulo de metodología.

Una vez secuenciadas, se identificaron todas ellas como *Acanthamoeba* genotipo T4.

La muestra MC2, fue seleccionada para el experimento de patogenicidad “*in vivo*”, resultando patógena ya que provocó infección en el ojo del animal de experimentación, como se especifica en dicho apartado del capítulo de resultados.

Todas las cepas, crecieron en cultivo axénico, lo que pone de manifiesto su virulencia.

Las muestras MC2 y MC4, fueron sometidas también al test de termotolerancia y osmotolerancia, mostrando el siguiente comportamiento:

En el test de termotolerancia ambas cepas a 37°C pasadas 72hs. crecieron de forma abundante (+++), sin embargo, en el cultivo a 42°C transcurrida 1 semana, se observó al microscopio óptico la presencia de quistes pero no de trofozoítos. En ese mismo cultivo a 30°C, en la placa correspondiente a la muestra MC2, se observa el exquistamiento y el crecimiento abundante de trofozoítos lo que pone de manifiesto que la ameba se enquista a 42°C pero los quistes se mantienen viables. Sin

embargo, en la cepa MC4 se observaron quistes, pero no crecimiento de trofozoítos.

En el test de osmotolerancia ambas cepas tuvieron un comportamiento similar, aumentando el diámetro del inóculo por encima de 5mm que se tomó como límite, observándose trofozoítos a una concentración de 0,3M y 0,5M de manitol, aunque a una concentración 1M de manitol no aumentó el diámetro del inóculo inicial en ninguna de ellas.

En el análisis filogenético y comparando las secuencias con las secuencias de referencia, destacan con una homología del 95,3% ente MC1 y MC3.

Todas corresponden al genotipo T4, como ya hemos comentado, aunque la que presenta mayor homología es la denominada PALG (99%-100%). Dicha ameba procede de la muestra clínica de control de un paciente sometido a cirugía y que se ha considerado portador asintomático de la ameba al no encontrarse ésta, causando patología alguna. Esta cepa también presentó un 98% de homología con la denominada MC4. (Fig. 8)

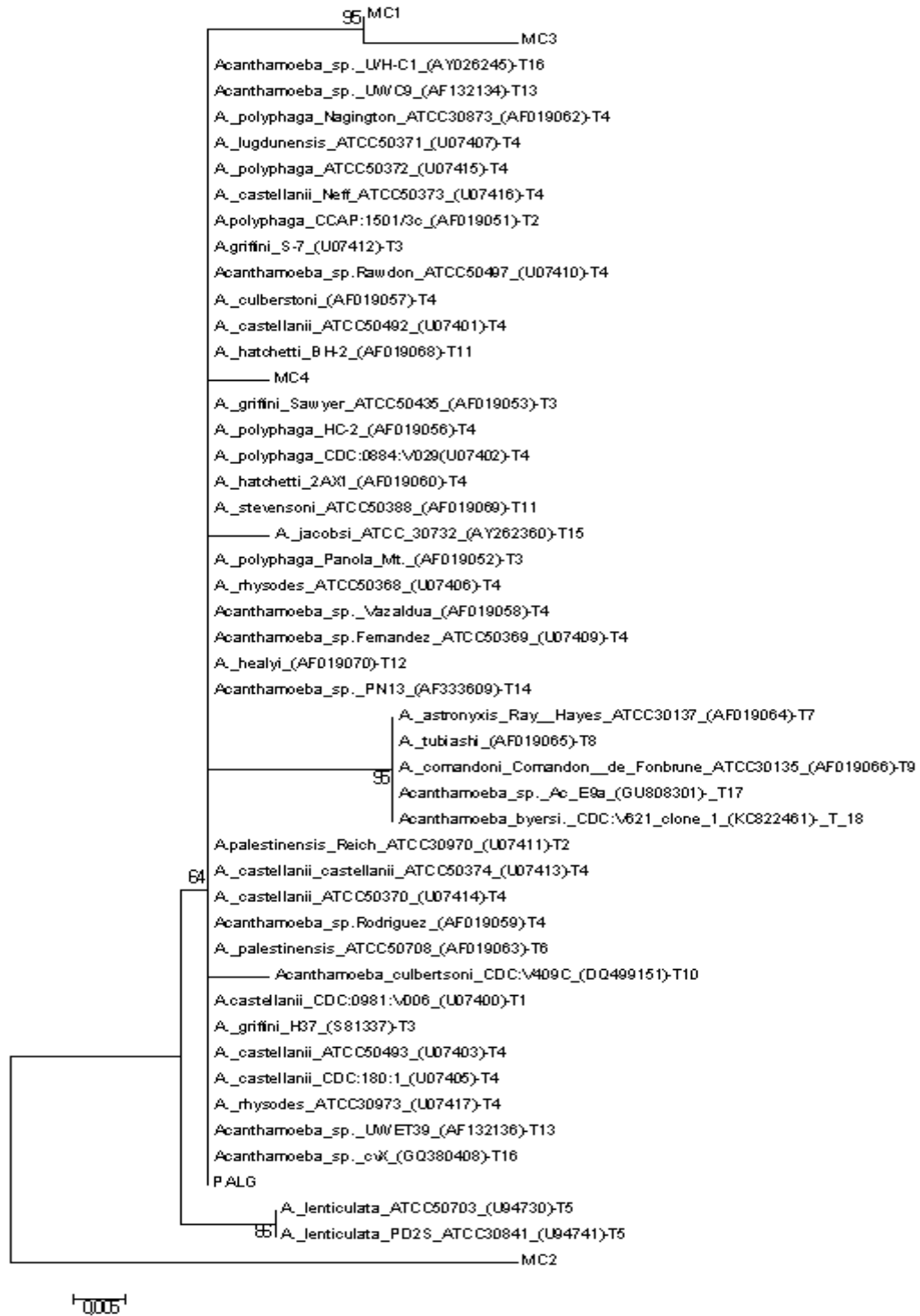


Fig 8. Árbol filogenético de los aislamientos de cepas clínicas del género *Acanthamoeba*, según la secuencia del fragmento DF3 y secuencias de los genotipos T1-T18 registradas en el GenBank.

## **D. RELACIÓN FILOGENÉTICA ENTRE TODAS LAS AMEBAS OBJETO DE ESTUDIO**

Se realizó el análisis comparativo de amebas del género *Acanthamoeba*, procedentes del agua de red pública, de las piscinas y las cepas clínicas, todas ellas estudiadas en este trabajo.

Las amebas procedentes de piscinas cubiertas no muestran 100% de homología con ninguna procedente de otras fuentes, con un máximo de homología de un 97,4% con otras amebas de agua de red y con la cepa clínica PALG.

En las piscinas al aire libre, sí que se encuentran mayores similitudes. La cepa F7 es idéntica o tiene un 100% de homología con las siguientes cepas aisladas de piscinas al aire libre: P28F, P31F, P36F, P37F, P37J, P44J, P46J, P46F, P47J, P47f, P82.2, P84F, P84J, P85F, P85J.

La F-7 aislada en una fuente ornamental, presenta identidad con las cepas F-22, EDAR y PALG (esto demuestra que la ameba vive en todo el ciclo del agua, sobrepasa el EDAR).

Entre las muestras P31F, C-11.2, que son procedentes de la misma zona geográfica de la ciudad, se encuentra un 94,6% de homología, lo que indica relación epidemiológica. Las cepas MC1 y MC3 se encuentran muy alejadas epidemiológicamente de las otras amebas caracterizadas, mientras que la MC2 se encuentra también alejada, formando un cluster con F-28, P8J (piscina cubierta) P43J (piscina al aire libre).

Las cepas denominadas EDAR, P-36F, P46F, P85F, PALG, MC4 y C-11.2 muestran un agrupamiento y la relación epidemiológica entre ellas. (Fig. 9).

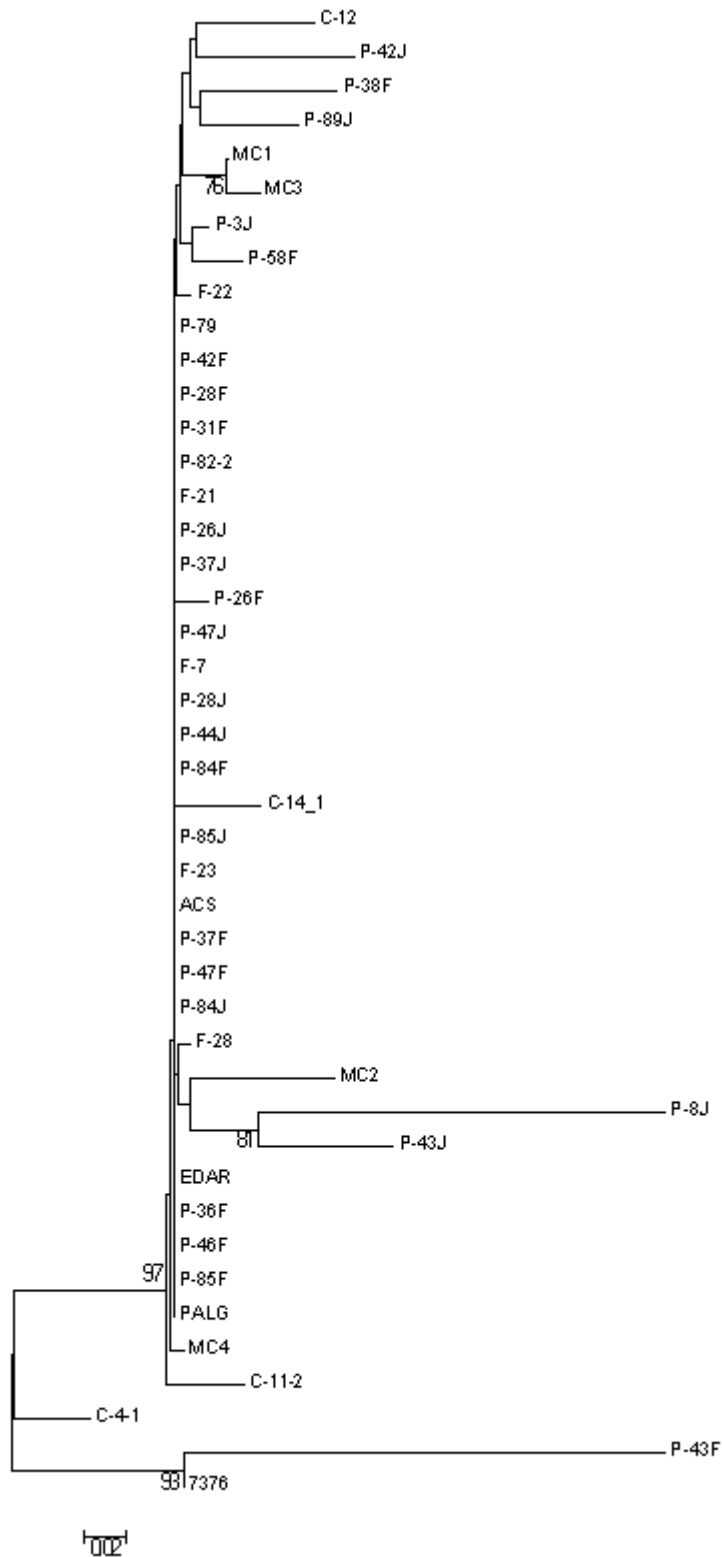


Fig 9. Estudio filogenético de cepas del género *Acanthamoeba* aisladas en distintas fuentes de este trabajo.

## **V. DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

---

### A. AGUAS DE RED

Las amebas de vida libre, protozoos que se encuentran distribuidos ampliamente en el medioambiente, han cobrado recientemente mayor atención por su ya demostrada capacidad para adaptarse a las condiciones adversas naturales o artificiales del medio ambiente donde se desarrollan, sortear el sistema inmune y comportarse como parásitos oportunistas o ser vehículo de transmisión de otros patógenos al ser humano y a los animales, produciendo diferentes enfermedades de difícil diagnóstico y tratamiento.

Aunque son microorganismos ubicuos en la naturaleza, es el medio acuático el que utilizan principalmente como medio de desarrollo y dispersión. Los estudios publicados, que hace referencia a la identificación de AVL en este medio, son abundantes. Se han realizado estudios en sistemas de agua de manantial, ríos, agua corriente, con el fin de determinar la presencia de estas amebas en los ambientes acuáticos relacionados con los hábitats humanos (Radford et al., 1998; Booton et al., 2002; Ettinger et al., 2003; Seal et al 2003).

Ya que el hábitat más habitual es el medio acuático, se planteó realizar un análisis de la situación del agua de red, que con más frecuencia está en contacto con el ser humano, en la provincia de Zaragoza.

El origen de las muestras de agua para el estudio correspondió al protocolo de vigilancia y control que realiza el Instituto municipal de Salud Pública (Ayuntamiento de Zaragoza) considerando entre otras, las fuentes ornamentales, el agua corriente de uso doméstico, agua caliente sanitaria así como el de otras localizaciones para diferentes usos públicos que

incluyen las piscinas recreativas, como formas de contacto frecuente con el ser humano.

### **Distribución de las AVL en el agua de red.**

El riesgo por contacto con el agua de las fuentes ornamentales es muy relativo, si realmente se hace de ellas un uso adecuado, aunque en épocas estivales, debido a las altas temperaturas, no es el esperado. No obstante las instituciones sanitarias, siguiendo el Real Decreto 2013, y previamente el 104/2003, realiza el control de estos cuerpos de agua ya que pueden constituir un serio riesgo sanitario fundamentalmente por su implicación en la transmisión de *Legionella*, que ha dado lugar, en ocasiones, a la aparición de brotes de legionelosis, y en los que las AVL tienen un importante papel como reservorio de estas bacterias. El agua corriente particular, sin embargo, supone un contacto diario y aunque el riesgo sigue limitándose a esos sujetos con factores de riesgo, se debe informar a la población y si es necesario, aumentar las precauciones.

Los resultados obtenidos al identificar AVL, pueden considerarse variables según la zona geográfica, el punto concreto de la toma del agua y la técnica utilizada para la identificación de las AVL.

En este estudio, de las 1298 muestras estudiadas, procedentes de aguas de red, el total de muestras positivas fueron 261 por identificación morfológica en cultivo lo que corresponde al 20% del total, muy similar al obtenido por Tsvetkova, en Bulgaria en 2004 (18,3%) (Tsvetkova et al., 2004).

Las muestras positivas correspondientes al agua de consumo, considerando como tales las tomadas de los grifos de las viviendas y pozos de suministro de agua, supone el 6% del total de muestras positivas. Este porcentaje es similar al encontrado por Thomas et al., en 2006, en Suiza (7,5%). Sin embargo, los resultados recogidos en la revisión realizada por



Thomas & Ashbolt, 2011, con 19 estudios analizados, realizados en diversos países (América del norte, América del sur, Asia y Europa) muestran que la identificación de AVL superaba en la mayoría de los casos el 10%, algo mayor a lo detectado en este trabajo (Thomas et al., 2006; Thomas & Ashbolt, 2011).

En el estudio realizado en fuentes de agua para consumo, en las Islas Canarias (Lorenzo-Morales et al., 2005; Tenerife, España) se obtuvo un resultado del 59,5% de las muestras positivas solo para *Acanthamoeba*, por lo que el porcentaje de amebas de vida libre total debe de ser mucho más alto. Tal diferencia en los resultados, se justifica por la diferente climatología y situación geográfica entre ambas comunidades. No obstante, hay que considerar que también otros factores influyen en la obtención de cultivos positivos y entre ellos cabe destacar el volumen de la muestra tomada, el lugar y protocolo de la toma de muestra, factores físicos como la climatología, pero también hay otros factores importantes como el sistema de distribución de agua.

En el sistema de distribución de agua, se puede considerar el diseño de las conducciones en el que además influye la orografía del terreno, su antigüedad y los materiales de que dichas conducciones se encuentran construidas. Esto se debe a la tendencia de las amebas de vida libre a formar biofilms en los codos de estas conducciones que resultan más sólidos y tienen mayor continuidad cuando más antiguas son y cuanto más poroso es el material del que se encuentran construidas. De esta forma, cuando se recoge la muestra solo se recogen aquellas amebas que se encuentran libres, que son minoría frente a las que forman parte de los biofilms, y por ello también se considera que una muestra de un litro que contiene amebas potencialmente patógenas supone un riesgo potencial para la salud en función de su uso, y cuanto mayor sea la muestra tomada mayor será también la probabilidad de que puedan detectarse amebas de

vida libre. En relación con lo comentado se puede observar que la prevalencia, en estudios realizados en Canadá (Barbeau & Buhurt, 2001) e Israel (Kahane et al., 2004) superó el 90%, aunque el porcentaje tan elevado se debe a que fue el biofilm de los grifos el estudiado y no el agua libre. Por otra parte, la frecuencia de la identificación de AVL en estos estudios citados del agua destinada a diferentes usos públicos, fue del 91,9% (aljibes, depósitos, fuentes públicas), lo que coincide con el obtenido en este trabajo.

Analizando los resultados del presente estudio, el agua de red pública no doméstica, tiene un porcentaje mucho mayor que la doméstica (91,1% frente al 6,1%) lo que apoya la hipótesis de que una parte de la colonización del agua se puede producir en el trascurso de la distribución, encontrándose en mejores condiciones la red de distribución doméstica que el resto de la red pública destinada para otros usos, por lo que uno de los objetivos para reducir su impacto sería aconsejar a las autoridades competentes, el mantenimiento adecuado de la red de distribución y la elección de materiales adecuados.

Es importante señalar que las amebas que alcanzan las conducciones de agua proceden en su origen de plantas de potabilización de aguas en que han sufrido desinfecciones para hacer al agua apta para el uso. Posteriormente, pueden colonizar las conducciones de agua y diseminarse. En cualquier caso se debe de pensar que se trata de amebas particularmente resistentes a los métodos de desinfección utilizados.

Si observamos el resultado obtenido por García et al., 2013, del análisis de tres plantas potabilizadoras (España) fue similar al obtenido en este caso, ya que se identificó la presencia de AVL en 7,2% de las muestras de agua al final del tratamiento (García et al., 2013). En el estudio de Hoffmann & Michel (2001) coincide, en que el tratamiento del agua en las

plantas potabilizadoras reducen el número de AVL (Hoffmann & Michel 2001).

No obstante, la eliminación de estos microorganismos de los sistemas de agua de red, es imposible ya que han resultado resistentes a diversos desinfectantes, entre los que se encuentran los utilizados habitualmente para tratar el agua de consumo (García et al., 2013). Se ha demostrado la resistencia de los quistes de *Acanthamoeba* spp. a diversos desinfectantes que contienen ácido peracético, peróxido de hidrógeno, orto-ftalaldehido, glutaraldehido, etanol e hipoclorito de sodio, aunque algunos han demostrado mayor eficacia pero con un tiempo de incubación alto (Coulon et al., 2010).

En los puntos denominados “playas recreativas” se han encontrado AVL en el 100% (14/14) de las muestras. Las “playas del Ebro” son estructuras artificiales, construidas con fines recreativos en un meandro del río Ebro, junto con las infraestructuras en que se celebró la Exposición Universal de 2008. Básicamente consisten en una playa de arena de sílice rodeada de 200 palmeras, con una piscina fluvial que se recicla de manera natural. Este sistema de depuración natural con varias fases de filtrado a través de diferentes lechos de arenas y que finaliza con un lagunaje con una presencia importante de vegetación acuática, puede explicar la elevada presencia de amebas. Es un sistema natural por el que se disminuye la contaminación del agua a través de las reacciones biológicas que provocan diversos microorganismos en la eliminación de gérmenes patógenos. En este caso son lagunas aerobias, es decir, con oxígeno disuelto en toda la masa de agua, necesario para que los citados microorganismos realicen su labor, sin embargo, está demostrado que se produce la proliferación de otros. Este resultado tan elevado suele darse en cuerpos de agua de las mismas características (Tsvetkova et al., 2004). En este caso se debe sugerir a organismos responsables de estas instalaciones, que proporcionen la

información sobre las medidas de protección a la población usuaria de estas zonas recreativas, con los factores de riesgo ya comentados ya que la eliminación de las AVL no sería recomendable ya que cumplen una importante acción en la regulación de las comunidades microbianas (Anderson et al., 2010).

Tras conseguir 261 cultivos positivos, se obtiene un rendimiento en las identificaciones por técnicas moleculares del 17.2%. Aparentemente este rendimiento puede ser considerado bajo, por lo que es necesario puntualizar varios aspectos del trabajo. En primer lugar, se trata de muestras ambientales que contienen una gran variedad de microorganismos lo que hace que algunos de ellos no se puedan eliminar de la muestra mediante cultivo e interfieren en las PCRs menos específicas por lo que no se puede lograr la identificación. Además, se ha hecho hincapié en la identificación de aquellos géneros que pueden resultar potencialmente patógenos, aunque la utilización de cebadores menos específicos ha permitido identificar algunos géneros no incluidos entre estos. A estos factores se suma la presencia simultánea de varios géneros, especies o genotipos de amebas que hacen que aunque la amplificación por PCR resulte positiva, la secuencia posterior no pueda ser resuelta adecuadamente. Sin embargo, si lo comparamos con estudios de cuerpos de agua de similares características (agua de red) el resultado es muy similar, como el de Coşkun et al., 2013 en Turquía donde el porcentaje de AVL identificadas fue del 22% (Coşkun et al., 2013).

Respecto a los géneros potencialmente patógenos identificados, destaca *Hartmannella vermiformis* (17) con un porcentaje del 38,6% (denominada en este momento como *Vermamoeba vermiformis*), seguido de *Acanthamoeba* spp. 29,5% (13), 1 única cepa de *Paravalkamfia* (2,3%) no habiéndose identificado *Naegleria* spp.

Generalmente, el género más identificado es el de *Acanthamoeba* seguido de *Hartmannella*, *Vahlkamfia* y por último *Naegleria*. Así, la prevalencia en este trabajo del género *Hartmannella vermiformis* es mayor que el resto de los géneros, y difiere de los resultados obtenidos en otros estudios realizados en España, pero que se realizaron en cuerpos de agua de distintas características como embalses y plantas potabilizadoras (García et al., 2013). Si que coinciden con otros estudios que han utilizado técnicas similares, donde *Hartmannella* ha sido descrito como el género más representado de AVL en redes de agua potable (Hoffmann y Michel, 2001; Thomas et al., 2008; Valster et al., 2009; Valster et al., 2010; Delafont et al., 2013; Coşkun et al., 2013; Özçelik et al., 2012).

La posible patogenicidad de *Hartmannella* es una cuestión ampliamente discutida. Este último año, ha sido descrito el primer caso de queratitis producida por *Hartmannella*, en Irán, en una paciente portadora de lentes de contacto, resultando el cultivo de la lente positivo e identificando morfológicamente los quistes y por PCR, al género *Hartmannella* como agente causal, lo que puede aclarar el debate sobre la patogenicidad de este género de AVL (Abedkhozasteh et al., 2013).

No cabe duda de que entre los géneros considerados como patógenos, el más estudiado es *Acanthamoeba* puesto que también es el género que más frecuentemente se ha encontrado como causante de enfermedad en el hombre y en animales, siendo la más frecuente de ellas la queratitis amebiana. La queratitis es una de las enfermedades producida por amebas de vida libre reportada en pacientes inmunocompetentes (Marciano-Cabral et al., 2000) y en el 85-90% de los casos se da en portadores de lentes de contacto (Patel & Hammersmith 2008). La asociación entre el uso de lentes de contacto, medidas higiénicas no adecuadas como la limpieza de éstas con agua corriente donde se aislaron AVL del género *Acanthamoeba*, en la mayoría de los casos del genotipo T4 y

casos de queratitis está ampliamente documentada (Voyatzis & McElvanney, 2007; Radford et al., 2002; Üstüntürk & Zeybek, 2012). Incluso, Üstüntürk, en 2012 comprobó en un estudio como los estuches de lentes que no estaban en principio contaminados con microorganismos, después de un uso prolongado y limpieza con agua corriente de forma inadecuada, resultaron positivos por cultivo y el porcentaje de muestras positivas para AVL fue alrededor del 30% en el biofilm de los estuches. Esto ilustra el riesgo que supone el uso de lentes de contacto de forma prolongada y una higiene y mantenimiento con agua corriente, por lo que se hace necesario informar a los usuarios del cuidado y uso adecuado. En este trabajo el 29,5% de las AVL identificadas corresponden a *Acanthamoeba* y de ellas, el 38,5% se encontró en aguas de uso particular o en agua caliente sanitaria.

La distribución del género *Acanthamoeba* difiere de unos estudios a otros, aunque los cuerpos de agua estudiados, y las técnicas utilizadas sean similares. Los resultados aquí obtenidos coinciden con los obtenidos en Pakistán y México donde en el agua de red, un 30% y 27,5% respectivamente de las muestras estudiadas, resultaron positivas para *Acanthamoeba* (Yousuf et al., 2013; Bonilla-Lemus et al., 2010).

En este caso, la proporción es más elevada que la obtenida en los estudios realizados en Turquía y Japón, donde los valores hallados para *Acanthamoeba* están alrededor del 5% (Ozcelik et al., 2012; Edagawa 2009). Pero hay documentados estudios en España y Brasil donde la proporción es mucho más elevada, correspondiendo a valores superiores al 40% (Lorenzo-Morales et al., 2005; Winck et al., 2011). Sería interesante establecer en próximos trabajos, variables como el estado de la red de distribución, materiales utilizados en la construcción y mantenimiento de los depósitos en cuanto a la formación de biofilms, que puedan dar explicación y evidencia a dicha hipótesis.

Del género *Paravahlkamfia* spp. se aisló una cepa en una fuente ornamental. Este género, ha sido aislado en el agua de una planta de tratamiento de aguas residuales en España (García et al., 2011), del líquido cefalorraquídeo de un paciente con síntomas de PAM (Visvesvara et al., 2009), de una muestra clínica de un paciente con queratitis no portador de lentes de contacto ni historia de lesión de córnea previa en Turquía (Ozkoc et al., 2008) e incluso del intestino de un lagarto, supuestamente formando parte de la flora saprofita ya que no se observaron lesiones celulares (Schuster et al., 2003). Sin embargo, se observan diferencias entre todas ellas, ya que las cepas aisladas en el agua y procedente del raspado corneal son capaces de crecer en cultivo de ANN con *E. coli* mientras que las cepas aisladas en el líquido cefalorraquídeo y en el intestino del lagarto eran termotolerantes y no crecían en el medio citado, por lo que es necesario realizar otros estudios que diferencien entre especies o genotipo, sus características morfológicas y su ciclo biológico para determinar la capacidad patógena de cada una de ellas.

El resultado negativo para otras AVL como *Balamuthia mandrillaris* o *Sappinia*, puede deberse a que el tipo de cultivo utilizado no es adecuado para estos géneros. En España, hasta el momento sólo se ha detectado un caso aislado en el agua aunque no se pudo demostrar la viabilidad de la ameba por la técnica utilizada en su identificación (Magnet A et al., 2013).

El resultado negativo para *Naegleria* pueden deberse al efecto adecuado de los productos desinfectantes ya que en las plantas potabilizadoras sí que fueron detectadas (García et al., 2013) y posteriormente en cuerpos de agua naturales de esta misma Comunidad, aunque las especies identificadas no correspondieron a las ya descritas como patógenas. No obstante, en este estudio no se utilizó una PCR específica para *Naegleria* por lo que no podemos descartar su presencia.

De las amebas de vida libre consideradas no patógenas, se aislaron 13 cepas (29,6%) de los géneros *Rhogostoma schuessleri*, *Allovahlkamfia*, *Filamoeba Cercozoan*, *Amebozoa (Eimeriidae)*, *Echinamoeba exudans* y *Euamoebida*. Ninguno de estos géneros ha sido descrito hasta el momento causando enfermedad en el hombre o los animales.

En el estudio realizado 11 de las 13 amebas identificadas como *Acanthamoeba* corresponden al genotipo T4, y de las dos restantes una pertenece al genotipo T11 y la otra al T15. El género *Acanthamoeba* es identificado, en la mayoría de los casos como agente causal de queratitis y los genotipos que se han relacionados con esta enfermedad son T2, T3, T4 T5, T6, T11, T15 (Gast et al. 1996; Walochnik et al. 2000; Booton et al. 2002; De Jonckheere 2003; Maghsood et al. 2005; Spanakos et al. 2006; Di Cave et al. 2009; Ledee et al. 2009), aunque el genotipo T4 es el predominante. Esto pone de manifiesto la presencia en el agua de red de los genotipos reconocidos como causantes de queratitis, siendo el T4 el más virulento y el principal responsable de infecciones en muchos países, así como el más frecuente (Booton et al., 2005; Khan, 2006; Ledee et al., 2009; Magnet et al., 2013; Bonilla-Lemus et al., 2012; Dendana et al., 2013). Por otra parte, no se puede afirmar que el genotipo T4 sea el único presente ya que existe la posibilidad de que en muestras mixtas de diferentes genotipos, el T4 haya amplificado de forma preferente o de que al realizar el cultivo se seleccionen genotipos más resistente a las condiciones ambientales y por lo tanto los más adaptados. Comparando las secuencias de las amebas genotipo T4 identificadas, se aprecia una gran dispersión con homologías que oscilan entre el 88% y el 97,7%, no habiendo encontrado dos amebas idénticas. Esto indica una baja relación epidemiológica entre ellas que avalaría una posible territorialidad de estos microorganismos. Es preciso no obstante recordar que las amebas que se están identificando son aquellas que circulan libremente y pueden suponer un mayor riesgo, pudiendo



quedar una gran y diversa población formando parte de los biofilms que se forman en las conducciones.

El genotipo T15 ha sido encontrado en muestras ambientales ampliamente distribuidas geográficamente (Huang y Hsu, 2010; Tanveer et al, 2013) pero raramente ha sido identificado como agente causal de infecciones en humanos, aunque recientemente ha sido aislado de muestras clínicas procedente de pacientes con queratitis en Suecia (Sharifi et al., 2010) y en Italia (Di Cave et al., 2014) e incluso en algún caso muy resistente al tratamiento (Iovieno et al., 2010). En España también ha sido documentado un caso de queratitis por *Acanthamoeba* genotipo T11 (Arnalich-Montiel et al., 2014).

### **Asociación entre AVL y microorganismos resistentes a las amebas (MRA)**

Otro aspecto en el que las AVL juegan un importante papel a nivel ecológico y sanitario, es su capacidad para internalizar a otros microorganismos que pueden ser patógenos (Goñi et al., 2014) Esto supone un riesgo añadido por la capacidad de colonización de los sistemas de distribución de patógenos y la capacidad de las amebas para albergarlos en su interior y protegerlos de desinfectantes, cuando se encuentran en la forma resistente o quiste (Loret et al., 2008).

Los resultados recogidos muestran una alta presencia de las bacterias estudiadas en el interior de las amebas (52%), aunque de los géneros estudiados solamente se han detectado *Pseudomonas* y *Mycobacterium*. No ha ocurrido lo mismo con *Legionella* y *Microcystis*. *Legionella* es uno de los patógenos con relación simbiótica con amebas más estudiado y frecuente aunque su ausencia en este caso puede encontrarse justificada por el estricto control que llevan a cabo las instituciones

municipales junto con la selección al azar de las muestras. En el caso de *Microcystis*, su presencia es más habitual en aguas naturales de estanques y lagunas donde puede formar floraciones tóxicas aunque se encuentra documentada su baja presencia en estos momentos en las aguas de Aragón (García et al., 2013).

El total de muestras estudiadas para patógenos intraameba MRA (microorganismos resistentes a las amebas) no fue muy elevado, únicamente 25 elegidas al azar, de las que resultaron 13 cepas (52%) de amebas positivas para MRA, por lo que no se han comparado porcentajes pero se puede afirmar que existe el riesgo en fuentes ornamentales, agua caliente sanitaria, agua de consumo particular.

En el género *Acanthamoeba* los patógenos intraameba que han resultado identificados han sido: en 3 cepas *Pseudomonas* (en fuentes ornamentales y agua caliente sanitaria), 1 cepa *Mycobacterium* (en fuentes ornamentales) y en 1 cepa, ambos géneros en una depuradora.

La asociación entre *Acanthamoeba* y *Pseudomonas* está documentada en estudios de casos clínicos de queratitis en portadores de lentes de contacto, en los que el cultivo de las lentes o del raspado corneal evidenció la coinfección, y en la mayoría de ellos, el estudio epidemiológico de los casos, relacionó la infección con el mantenimiento inadecuado de la lente con agua corriente (Jiaxu Hong et al., 2014; Iovieno et al., 2010). Incluso en el trabajo de Sharma et al., 2013, se comprobó que los casos de coinfección presentaban una toxicidad corneal significativamente mayor, en comparación con los aislados sin endosimbiontes (Sharma et al., 2013).

El estudio realizado por Üstüntürk et al., 2012, en los estuches de lentes de contacto de 50 personas asintomáticas y en el agua corriente de sus domicilios, se encontró que se hallaban contaminados por *Pseudomonas*, entre otros microorganismos, aunque el resultado fue

negativo para AVL, pero al analizar el agua corriente de esos mismos sujetos de la muestra, se obtuvo el interesante resultado de que existían AVL pero no *Pseudomonas*. Este hecho podría respaldar la hipótesis de que los desinfectantes son efectivos frente a las bacterias libres en el agua pero no sobre las protegidas en el interior de los quistes de las AVL y una vez que el medio se torna adecuado (estuches de lentes con un inadecuado mantenimiento) las bacterias se liberan, en este caso destruyendo la ameba que lo protegía (Üstüntürk et al., 2012).

Las infecciones nosocomiales, dada su alta prevalencia, y las consecuencias sobre la morbi-mortalidad y el coste humano y sanitario que conllevan, son un problema importante que deben resolver las autoridades sanitarias. Conocemos en muchos casos las fuentes de estos gérmenes como son el personal sanitario, visitantes, fómites pero también está demostrada la presencia en los sistemas de distribución del agua de los hospitales la presencia de patógenos como *Pseudomonas*, *Mycobacterium* no tuberculosas (Ovrustsky et al., 2013) y *Legionella* en el agua libre, pero sobretudo en los biofilms. La mayor prevalencia de estos patógenos se ha relacionado con la presencia de AVL (Thomas et al., 2006; Drancourt et al., 2007). Estos patógenos son protegidos por las AVL en situaciones adversas y devueltos posteriormente al medio, a partir del cual se emiten al aire a través de aerosoles, por el agua caliente o contaminando material médico.

En la única muestra de agua caliente sanitaria que se secuenció y realizó el análisis de patógenos, la bacteria que se obtuvo fue *Pseudomonas* sp. La presencia de *Pseudomonas* en el agua corriente está demostrada aunque son sensibles a los sistemas de desinfección. Sin embargo, se encuentran en mayor número donde existe un sustrato, como es el biofilm en las redes de conducción, donde se aíslan en mayor proporción AVL, que sirven a estas bacterias como reservorio y protección, como ya hemos comentado. Esta bacteria está relacionada con infecciones como otitis,

neumonías, infecciones de la piel, aunque la colonización del tracto digestivo no es frecuente salvo en pacientes tratados con antibióticos, que destruyen la flora saprofita intestinal. Está comprobado que la colonización del agua por estas bacterias, se produce cuanto mayor es la temperatura del agua, aumentando el riesgo de producirse aerosoles y colonizar las vías respiratorias y a través de heridas en la piel (Mena et al., 2009).

La supervivencia de estas bacterias en el interior de los quistes de AVL, está demostrado pero lo que resulta más interesante son las altas tasas de replicación en el interior del género *Acanthamoeba lenticulata* de *Mycobacterium avium* y su viabilidad una vez liberado al exterior. Estos resultados podrían tener importantes consecuencias para la ecología de *M. avium*, en redes de agua potable y la epidemiología de la enfermedad, debido a ésta y otras especies (Ovrutsky et al., 2013).

Los patógenos identificados por la multiplex-PCR en *Hartmannella vermiformis* fueron, *Pseudomonas* spp. (2 cepa) y *Mycobacterium* spp (1 cepa) aunque no aparecen en un número elevado también hay que tener en cuenta que la muestra era pequeña (25 casos estudiados). Las amebas de este género, suponen un riesgo por el patógeno que albergan y por si mismas ya que se ha comprobado su patogenicidad junto a *Pseudomonas*, en casos de queratitis y en otros estudios se demuestra la supervivencia de *Candida* sp. junto a *Hartmannella vermiformis* en el agua de grifo (Vanessa et al., 2012), así como de *Legionella* en el interior de *Hartmannella* en los biofilms de los sistemas de distribución del agua (Kuiper et al., 2004).

El estudio realizado por Kuiper et al., en 2004, demostró también, que *L. pneumophila* se multiplica en los trofozoítos de *H. vermiformis* que están presentes en las biopelículas acuáticas que se forman en materiales plásticos en contacto con el agua del grifo. Diferentes materiales (PVCu y PVCP) dieron diferentes concentraciones de biopelícula (concentraciones

totales de ATP), y las concentraciones totales de ATP mayores dieron mayores concentraciones de *L. pneumophila*. La proliferación de *L. pneumophila* resultó debida a su multiplicación intracelular en el interior de *H. vermiformis* y en presencia de una alta concentración de bacterias heterótrofas en la biopelícula.

Amebas de vida libre consideradas no patógenas, se aislaron 13 cepas (28,8%). Este hecho adquiere relevancia, cuando en el análisis posterior de patógenos o bacterias intraamebas, en el cual por la multiplex-PCR se detectaba simultáneamente 5 patógenos, identificamos microorganismos en 5 de ellas de los géneros *Rhogostoma schuessleri*, *Euamoebida*, *Amebozoa*. Amebas de vida libre de géneros similares a *Echinamoeba*, se aislaron en una planta de tratamiento de agua de una muestra procedente de un punto tratado con ozono, y se identificó *Mycobacterium mucogenicum* en el interior de dicha ameba (Thomas et al., 2008).

Hasta donde conocemos, no existe hasta el momento, en la literatura publicada, ningún estudio que relacione los géneros identificados en este trabajo como AVL potencialmente no patógenas, con los patógenos *Mycobacterium* y *Pseudomonas*, aunque sí existen numerosas publicaciones que relacionan y han estudiado la interacción de estas bacterias con otros géneros de amebas de vida libre consideradas como patógenos oportunistas. En la revisión realizada por Thomas et al., en 2010 se identifican hasta 102 especies de bacterias que sobreviven e interrelacionan en contacto con diversos géneros de amebas (Thomas et al., 2010). Por lo tanto, este trabajo supone la primera identificación de bacterias resistentes a amebas en estos géneros.

La presencia de estos microorganismos en los sistemas de distribución de agua, sí está controlado por las instituciones sanitarias que

realizan tratamiento del agua y controles rutinarios, sin embargo, estos tratamientos eliminan el patógeno libre pero no el que se encuentra en el interior de la ameba. La desinfección y eliminación en estos sistemas de las AVL, es prácticamente imposible, porque los quistes de las amebas son resistente a la mayoría de los compuestos que se utilizan en el tratamiento del agua (Coulon et al., 2010) y como concluyen Thomas et al., 2004, en el trabajo realizado tras el tratamiento del sistema de distribución de agua con diferentes compuestos, el dióxido de cloro en tratamiento continuo fue el más eficaz para eliminar la contaminación del agua por *Legionella* y la eliminación del biofilm pero no eliminó los quistes de AVL lo que permitió una vez suspendido el tratamiento del agua, la recolonización del sistema por bacterias. Por lo tanto, el hecho de que existan AVL en los sistemas de distribución de agua estudiados que albergan en su interior bacterias como *Mycobacterium* spp y *Pseudomonas* spp en el 52% de las muestras estudiadas en este trabajo, ponen de manifiesto el riesgo de infecciones, sobre todo de aquellas consideradas nosocomiales en los hospitales dado el deterioro inmunológico de los pacientes.

En el estudio realizado en Israel el resultado del análisis realizado en agua desalinizada, fue negativo para AVL lo que induce a considerar la sal como un producto que impide la proliferación de estos microorganismos. Sería aconsejable realizar más ensayos para comprobar su efectividad.

El no tener resultados de otros patógenos resistentes a las amebas, se debe a que se utilizó la técnica de la multiplex-PCR diseñada por Calvo et al., 2013, específica para 5 gérmenes, lo que quiere decir que no se puede afirmar que no existan en el interior de las AVL, otros patógenos para el ser humano como *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* documentado por otros autores (Calvo et al., 2013; Yousuf et al., 2013).

## **B. AGUAS RECREATIVAS**

En los últimos años en España se están realizando numerosos estudios epidemiológicos sobre la distribución de AVL en nuestro entorno, agua de mar, arena, embalses, pantanos, plantas de tratamiento de aguas (García et al., 2013; Magnet et al., 2013; Urrutia-Cordero et al., 2013; Lorenzo-morales et al., 2005; Lorenzo-Morales et al., 2005b; Arias Fernández et al., 1989; Madrigal Sesma, et al., 1988).

El riesgo de contraer enfermedades producidas por amebas, ha sido documentado en países como Mejiro (Rivera et al., 1982, 1993), Italia (Scaglia et al., 1983) República de Serbia (Kranjcic-Zec et al., 1991), Bélgica (De Jonhheere et al., 1979), Alemania (Janitschke et al., 2010; Michel & Schneider 1980) y Francia (Derr-Harf. et al., 1978; Pernin & Riany 1978). En España, se realizó algún estudio en piscinas, como el de González de la Cuesta et al., en 1987, concretamente en Galicia, sin embargo, no existe ningún trabajo reciente, referente al riesgo potencial que para la salud pública conlleva, la presencia de amebas de vida libre en aguas de piscinas o aguas recreativas (Gonzalez de la Cuesta et al., 1987).

La consecuencia es una menor identificación del riesgo y alerta en estos medios acuáticos, que puede afectar más a personas inmunocomprometidas como embarazadas, personas con tratamiento quimioterápico o antibiótico prolongado, trasplantados o portadores de lentes de contacto o personas sanas con mucho tiempo de contacto con el agua. Con la premisa de que las amebas de vida libre se encuentran muy presentes en los ambientes húmedos y algunas de ellas, como *Acanthamoeba*, son muy resistentes a la cloración y desinfección pero las medidas de prevención son en principio sencillas, se diseñó este estudio para valorar realmente la presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas en aguas recreativas.

Posteriormente se incluyó la determinación de otros parásitos como *Cryptosporidium* y *Giardia*, por la posibilidad de llevar a cabo su determinación por técnicas moleculares en las mismas muestras recogidas.

El estudio se llevó a cabo sobre 16 instalaciones, que incluyen un total de 49 vasos si consideramos como tales los jacuzzi y bañeras de hidromasaje. El tamaño de muestra se considera suficiente ya que si bien no son muchas instalaciones, sí que se encuentran incluidas todas las piscinas públicas localizadas en el núcleo urbano de Zaragoza. No se han incluido las correspondientes a barrios rurales.

Las instalaciones estudiadas se abastecen de agua de red de esta ciudad, lo que permite la comparación de las amebas aisladas en ellas con las aisladas en la primera parte del estudio. Tienen diferentes métodos para la depuración de las aguas, aunque no fue posible disponer de estos datos en todos los casos. También pudo existir una gran variación respecto a la afluencia de usuarios, siendo éste un dato del que tampoco disponemos.

### ***Identificación de Amebas de Vida Libre***

Cuando se analizaron las muestras recogidas, se obtuvo un 53,3% de muestras positivas. Posteriormente, para el análisis de los resultados de los casos positivos de AVL, se consideraron como vasos positivos aquellos en los que cualquiera de las tres muestras tomadas resultó positiva y negativo cuando todas las muestras fueron negativas. En este caso la frecuencia de AVL obtenida en los vasos estudiados fue mucho más elevada, alcanzando el 83,7%, resultado que difiere del estudio realizado en piscinas en Finlandia en el que se identificaron como positivas el 41% (Vesaluoma et al., 1995). Esto puede significar que el sistema de limpieza y depuración de piscinas en la ciudad de Helsinki, donde se realizó el estudio, fuera muy efectivo, ya que estos resultados difieren de estudios en otras zonas de Finlandia, o que las muestras se tomaron a 20 cm. de la superficie, y según los resultados



obtenidos en este estudio, en este punto también se obtuvo una proporción menor de resultados positivos. En el estudio de Vesalouma et al., 1995, el número de vasos climatizados superaba al de vasos al aire libre, lo que puede justificar también un menor porcentaje de casos positivos frente a los resultados obtenidos.

En nuestro estudio, el porcentaje de AVL positivas en las piscinas al aire libre (75,3%) resultó superior al de las piscinas cubiertas (25%), siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), al igual que en el estudio de Górnik et al., 2004 lo que le lleva a concluir que el riesgo de infecciones por AVL en piscinas al aire libre es mayor que en las cubiertas (Górnik et al., 2004). Resultados muy similares son los documentados en el estudio de Tsvetkova et al., 2004 realizado en muestras medioambientales, donde resultaron positivas para AVL el 85,7 % y el 37,5% de las muestras de piscinas al aire libre y cubiertas, respectivamente, resultados similares a los obtenidos por Gianinazzi en Suiza en el 2010 (Tsvetkova et al., 2004; Gianinazzi et al., 2010). Esto sugiere que las amebas de vida libre, como microorganismos medioambientales que son, se transmiten desde el suelo al interior del vaso de la piscina transportadas muchas veces por los propios usuarios de las instalaciones sobre todo, cuando no se observan estrictamente las medidas higiénicas recomendadas. En este sentido las instalaciones cubiertas están más controladas y protegidas al poseer zonas de ducha de paso obligado para entrar en la piscina, por la falta de contacto con suelos de tierra que contengan las amebas y en algunas ocasiones, por el menor aforo de usuarios (Rivera et al., 1991.).

También se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en función del lugar de la toma de la muestra. Al tomarse en la superficie, el número de positivos resultó mayor, frente a las muestras recogidas a 30 cm de profundidad, o al biofilm de la pared con hisopo, con un p valor  $< 0,05$ . Este resultado coincide con el estudio de Init, et al., 2010,

para la detección de AVL en piscinas en Malasia, que obtuvieron un mayor porcentaje de positivos cerca de la pared, y en la superficie (Init et al., 2010). Este hecho tiene una explicación, ya que las amebas de vida libre son microorganismos aerobios.

La menor frecuencia de resultados positivo en el biofilm de la pared del vaso, coincide de nuevo con el estudio de Vesaluoma et al 1995 que no se encontró en el biofilm de las paredes ningún resultado positivo. Este hecho resulta sorprendente ya que el sustrato bacteriano contenido en el biofilm de la pared, es un factor que debería favorecer la proliferación en esa localización de las AVL. También resaltaba en este artículo la higiene y limpieza de los vasos donde se llevó a cabo el estudio, lo que demuestra que la limpieza y mantenimiento adecuado de las superficies, influye positivamente (Vesaluoma et al., 1995).

Observando los resultados obtenidos para los cultivos de **AVL y los parámetros físico-químicos del agua**, y aunque no se ha obtenido significación estadística, sí que se aprecia cierta tendencia a tener cultivos negativos cuando el pH aumenta. Esto apoya la reciente ampliación de los límites superiores de valores de pH (de 7,8 a 8) que se reflejan en la última modificación de la legislación vigente (Real Decreto 2013; actualizado en marzo de 2014).

En cuanto a los niveles de cloro, la proporción de resultados negativos aumenta hasta el 61,8%, conforme la concentración de cloro es mayor (valores >2,1 mg/l de cloro), pero siguen aislándose cepas de las consideradas potencialmente patógenas.

Sin embargo, la variación de los niveles del cloro no influyó en la proporción de amebas de los géneros considerados como patógenos que se mantuvieron muy similares, incluso algunas cepas fueron aisladas por encima de 2,1 mg/l, aunque sí se observó al aumentar la concentración de

cloro, la disminución de aquellos géneros considerados hasta el momento como no patógenos. Estos resultados coinciden con los de Thomas et al., 2004, que tras el tratamiento del agua con dióxido de cloro de forma continua, a concentraciones mayores a las utilizadas en las piscinas, no se eliminaron los quistes de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Valhkamfia* (Thomas et al., 2004). No obstante, en la legislación de marzo de 2014, los límites se han ampliado en el límite inferior, en el que se da mayor supervivencia de amebas, aunque en este momento no podemos valorar su repercusión.

La identificación de amebas potencialmente patógenas en el cuerpo del agua de las piscinas, es decir en contacto directo con los usuarios aumenta el riesgo y difiere del estudio realizado por Gianinazzi et al., en piscinas de Suiza en 2010, donde se identificaron amebas, pero únicamente en las unidades de filtración, pero en ningún caso en el agua del vaso se identificaron especies patógenas (Gianinazzi et al., 2010). En el presente estudio no se dispone de los datos referentes a todos los sistemas de depuración de las instalaciones estudiadas, pero en su mayoría, los que se conocen disponen de un paso de filtrado por filtros de arena y posterior desinfección mediante dosificación de cloro o bromo. Sin embargo, en el estudio realizado por Thomas et al., 2008 en una planta de tratamiento de agua, un sistema de depuración de aguas en el que se realiza un filtrado con filtros de arena, seguido de desinfección con ozono, los autores concluyen que las amebas tampoco resultaron sensibles a dicho tratamiento, así mismo advierten que el filtro de arena se convierte en un sustrato adecuado para la multiplicación de amebas y por tanto la optimización del lavado y mantenimiento de los filtros, probablemente, ofrece la posibilidad de controlar las amebas y por lo tanto las bacterias intracelulares (Thomas et al., 2008).

**En cuanto a los géneros de las cepas de AVL**, la identificación del género *Acanthamoeba* en el agua corriente o en el suelo es muy frecuente. Existen estudios previos que identifican AVL patógenas en las piscinas en todo el mundo, en países como Malasia (Init et al., 2010) o el sur de Brasil (Caumo et al., 2009; Caumo et al 2011). En Europa, se han reportado casos en Alemania, Suiza, Finlandia, con resultado positivo (Kuhlencord et al., 1989; Vesaluoma et al., 1995). En España, los estudios realizados en Granada y Madrid (Madrigal-Sesma y Martinez 1985) y el último en Galicia por González de la Cuesta et al., 1987 en el que se aislaron en todas las piscinas estudiadas amebas de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Tetramitus rostramus* (González de la Cuesta et al., 1987).

El género *Acanthamoeba* se aísla con más frecuencia que otros géneros en los cuerpos de agua estudiados. Es considerada por ello, como la más abundante en el medioambiente. En este estudio el género *Acanthamoeba* se aisló en un 26,4% de las muestras de las piscinas resultado similar a la proporción de *Acanthamoeba* (20%) aisladas por Caumo et al., 2009 y 2011 (Caumo et al., 2009 y 2011).

Sin embargo, al analizar la distribución de las cepas identificadas en ambas instalaciones como positivas de este estudio, fue mayor la proporción del género *Hartmannella* (31,9%) y de otras AVL no patógenas (41,7%) que el de *Acanthamoeba*. En el caso de *Hartmannella*, aunque existe documentación sobre su capacidad patógena y de servir como hospedador de otros patógenos, su presencia en el medio ambiente no es considerada por algunos autores como un riesgo para la salud (De Jonckheere et al., 1998). Por este motivo, es difícil comparar resultados con otros estudios sobre la epidemiología de las AVL en el medio acuático, ya que las técnicas de detección que utilizan son específicas para *Acanthamoeba* o *Naegleria*, por lo que podrían existir una frecuencia alta del género *Harmannella* u otros, que quedan sin investigar. En el estudio de

Gianinnazzi et al., 2010 de los centros termales en Suiza, de todos los vasos estudiados sólo se aisló una cepa correspondiente *Hartmannella* spp. (1/ 9; 11,1%), mientras que *Acanthamoeba* se detectó un 55,5% y el resto correspondían a géneros considerados no patógenos.

Sí llamó la atención el hecho de que la proporción de *Hartmannella* y *Acanthamoeba*, cuando se consideraron separadamente las piscinas cubiertas y al aire libre, fue en las cubiertas en las que se obtuvieron resultados muy similares a las encontradas en el agua de red, lo que apoya la idea de que la aportación principal de estas amebas son las conducciones de agua de red, en las que por otra parte se encuentran amebas particularmente resistentes a los desinfectantes utilizados en las plantas potabilizadoras y por lo tanto también a los de las instalaciones de las propias piscinas.

Sin embargo, en las piscinas al aire libre, fue superior la proporción de *Acanthamoeba* (31,7%) que de *Hartmannella* (26,7%), lo que pone de manifiesto la contaminación ambiental del agua, ya que sí se aísla en mayor proporción en el suelo.

Al considerar los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* como **“géneros potencialmente patógenos”** y a otras amebas como **“géneros potencialmente no patógenos”** se obtuvo una proporción mayor de las patógenas, en ambas instalaciones (59,5% frente al 40,5%). Por otra parte el hecho de que las amebas pertenecientes a géneros potencialmente patógenos se hayan identificado en una proporción ligeramente superior que las no patógenas en los dos tipos de instalaciones estudiadas, podría estar relacionado con una mayor tolerancia de éstas a los desinfectantes y a las altas concentraciones de los mismos en las aguas de las piscinas como ya hemos comentado anteriormente.

Considerando las AVL patógenas identificadas en cada categoría de vaso, en las piscinas cubiertas se halló una mayor proporción en las recreativas (22,2%) y la menor en las de competición (6,7%), y en las piscinas al aire libre fue en la categoría de piscina pequeña en la que se obtuvo mayor proporción (32,4%) y la menor en la de chapoteo (14,7%). Las características de los usuarios de dichos vasos pueden ser la causa de las diferencias encontradas, siendo las frecuentadas por usuarios de menor edad, las que obtuvieron proporciones mayores, aunque no son resultados que tengan una significación estadística. En la categoría de chapoteo, destinadas a niños de más corta edad, los valores son más bajos que en las demás, sin embargo el agua de estos vasos está en constante renovación.

En lo que respecta al lugar de toma de muestra, a 30 cm prevalecen las amebas potencialmente patógenas, mientras que en los hisopos y en superficie las proporciones son muy similares. También se puede observar la capacidad de las amebas patógenas para vivir en un rango de pH un poco más amplio, mientras que las no patógenas estarían más restringidas entre el 7,2 a 7,6, sobre todo si consideramos que el caso a más de 7,7 que era patógena, se ha eliminado.

La distribución de las amebas potencialmente patógenas con respecto a los niveles de cloro, se observó que fue muy similar por encima y por debajo del valor establecido como límite adecuado (2,1 mg/l), mientras que las no patógenas disminuyeron la proporción al aumentar el cloro. Este resultado respalda las conclusiones de los autores que afirman, que las amebas consideradas como patógenas son más resistentes a los desinfectantes, como hemos comentado anteriormente (Thomas et al., 2008).

Según los resultados de este estudio, la concentración de cloro, en los parámetros adecuados (Rivera et al., 1991), no influye en la presencia de

amebas patógenas (Vesaluoma et al., 1995), lo que coincide con otros resultados De Jonckheere and Van de Voorde y Górnik et al., que demuestran la mayor resistencia de las cepas patógenas al cloro que las no patógenas. Podríamos por tanto considerar como un factor de virulencia la resistencia al cloro. Un resultado sin embargo, que resulta interesante es que en las piscinas estudiadas, si bien el número de amebas patógenas superaba al de no patógenas, sí se identificaron algunas de estas tanto morfológicamente como por PCR e incluso resultaron positivas para bacterias intraamebas, lo que nos sugiere una hipótesis y es la posible transferencia de factores de virulencia de las bacterias a las amebas y viceversa (Lamrabet et al., 2012).

En el **estudio filogenético de las cepas de *Acanthamoeba*** identificadas, la mayoría se incluyeron en el genotipo T4, que es el más frecuente y que generalmente se relaciona más con el desarrollo de enfermedad en el hombre. En el estudio de Deudona et al., 2013, los 4 casos de queratitis que se estudiaron se identificaron como *Acanthamoeba* genotipo T4 (Dendana et al., 2013). También fue identificado en una proporción mayor, en el trabajo de Montiel- Arnalich et al., en 2014 realizado en España en 17 pacientes diagnosticados de queratitis y en menor proporción los genotipos T3 y T11, que aunque considerados menos frecuentes y menos virulentos, sin embargo, tuvieron en todos los casos, una respuesta menos satisfactoria al tratamiento y por lo tanto peor pronóstico (Montiel-Arnalich et al., 2014).

El genotipo T4 se considera el más virulento por la mayor capacidad de adherirse al tejido corneal y producir citotoxicidad severa (Ledee et al., 2009; Maghsood et al., 2005). El genotipo T5 también es considerado como un contaminante común del agua de las piscinas aunque no identificado hasta el momento como agente causal de queratitis (Caumo & Rottet, 2011), sin embargo, en el presente estudio no se ha identificado ninguna

cepa de ese genotipo. El genotipo T4, presenta una mayor variabilidad genética entre las cepas que lo componen. Como ya se ha comentado en la sección de resultados, la cepa P42J presenta una mayor homología con el cluster formado por los genotipos T7/T8/T9/T17/ y T18, aunque se encuentra más cercana al genotipo T9. En la misma piscina se identifica la *Acanthamoeba* P42F, perteneciente al genotipo T4 y con solo un 85% de homología con la anterior, indicando que es posible la presencia de diferentes poblaciones pertenecientes a un mismo género en la misma piscina o en el mismo ecosistema. Esto de alguna forma valida la combinación de métodos de identificación utilizada en este trabajo, ya que la utilización de una sola PCR podría dar como resultado la identificación de la población mayoritaria, enmascarando las que se encuentren de forma minoritaria. Por ello, también la siembra previa en placa y posterior selección de varios clones para su análisis, aumenta la eficacia del método frente al análisis molecular directo de las muestras de agua. Por otra parte, la identificación de *Acanthamoeba* con 100% de homología procedentes de instalaciones geográficamente muy alejadas, apoya la idea de que la aportación mayoritaria de estas amebas se produce a través de los conductos de distribución del agua de red, aunque si comparamos los resultados con los genotipos identificados en las aguas de red de este estudio, no se encuentra ninguna en piscinas del genotipo T3 ni T15, quizá porque son más sensibles a los métodos de desinfección.

Otro aspecto importante del estudio, es la determinación de la posible **patogenicidad de las amebas identificadas**. Para ello, se seleccionaron 13 cepas que incluyeran cepas del género *Acanthamoeba* y *Hartmannella* y cepas tanto de piscinas cubiertas como de piscinas al aire libre. Como indicadores se utilizaron termotolerancia y osmotolerancia. De las amebas tanto del género *Acanthamoeba* como *Hartmannella* identificadas en las piscinas de este trabajo, demostraron ser termófilas, ya



que crecieron a 37°C, el 100% de las ensayadas, coincidiendo con el estudio de Tsvetkova et al., y Górnik et al., 2004 en el cual, de las amebas aisladas en agua de zonas de baño recreativas y agua de red pública, fueron seleccionadas las termófilas por crecimiento a 37°C. De ellas, 5 procedían de un centro recreativo y 1 de agua natural y se demostró su patogenicidad produciendo infección en los ratones de experimentación. En este trabajo, a 42°C no se produjo el crecimiento de ninguna de ellas, dato que difiere del de Gianinazzi et al., 2009 cuyas cepas demostraron una alta termotolerancia creciendo a esta temperatura o el de Tsvetkova et al., 2004 en el que el 14% de las cepas de piscinas al aire libre crecían a 45°C aunque al igual que en el presente estudio ninguna de las que se aislaron en piscinas cubiertas, creció a esa temperatura (Tsvetkova et al., 2004; Gianinazzi et al., 2009; Górnik et al., 2004). Lo que sí se demostró, es que aunque no se produce la proliferación de trofozoítos, los quistes permanecen viables ya que al someter esa misma muestra a 37°C, el crecimiento se produce en el 100% de los casos.

Para el análisis de la osmotolerancia a distintas concentraciones de manitol, se seleccionaron 9 cepas de *Acanthamoeba*, que corresponden a 7 de piscinas al aire libre (P28, P31, P37, P43, P46, P79, P84) y 2 de piscinas cubiertas (P3, P8). Se demostró la capacidad para crecer a concentraciones de hasta 0,5M de manitol de forma moderada y sin capacidad para crecer a concentraciones 1M. La osmotolerancia indica la capacidad de las cepas de adaptación a los tejidos (Khan & Tereen, 2003) y algunos estudios relacionan estos condicionantes fisiológicos con la virulencia de las cepas ambientales y clínicas (Gianinazzi et al., 2010). La capacidad patógena de *Acanthamoeba* es multifactorial y la capacidad de adaptación a la osmolaridad protectora que supone las lágrimas del ojo, favorece la citotoxicidad aunque existen otros factores como la capacidad de las amebas de producir proteasas, que favorece la adhesión a las células del epitelio corneal.

No siendo concluyentes los resultados proporcionados por los ensayos de termotolerancia y osmotolerancia, se realizó la inoculación en un conejo de una de las cepas aisladas de piscinas que resultó termotolerante (37°C) y osmotolerante (hasta 0.5M), al mismo tiempo que de una muestra de origen clínico que sirvió como control. Un primer ensayo, realizando una incisión con posterior inóculo de una suspensión de la muestra, que resultó negativo para ambas cepas, pone de manifiesto la dificultad del experimento, por lo que se modificó el modelo para realizar el contacto de una lentilla contaminada con la superficie de la córnea erosionada, como ocurre en las personas que se sumergen en las piscinas con las lentes de contacto. En este caso la cepa procedente de la piscina produjo una infección mucho más intensa que la producida por la muestra de origen clínico, poniendo de manifiesto su gran patogenicidad. Dicha cepa pertenece al genotipo T4 y no creció a 42°C aunque los quistes permanecieron viables al someterlos de nuevo a 30°C. En este punto es preciso discrepar a la vista de los resultados, de las conclusiones de Gianinazzi et al., 2009 que afirma, que si un cultivo de AVL no crece a dicha temperatura no puede ser patógena, ya que como se ha apuntado anteriormente se trata de un proceso multifactorial (Gianinazzi et al., 2009).

Esto demuestra de forma clara la existencia de un riesgo por la presencia de estas amebas en las piscinas, aunque es necesario tener en cuenta que su éxito en la infección depende de numerosos factores, pero que existen mecanismos de protección viables y sencillos de utilizar.

En el análisis de las muestras de las piscinas, sí se realizó una técnica de PCR específica para *Naegleria fowleri*. La ausencia del género *Naegleria* en todas las muestras estudiadas, tanto de aguas recreativas como las de fuentes y agua corriente, demuestra que de alguna manera los sistema de tratamiento del agua, son eficaces eliminándolas, antes de que estén en contacto con el sistema de distribución de red, ya que sí está demostrado

que existe en el medio ambiente de nuestro entorno (pantanos, plantas de tratamiento de agua) amebas de este género, aunque no se han encontrado hasta el momento el genotipo patógeno para el ser humano (García et al., 2013). Otra explicación a este hecho, como indica Górnik et al., 2004, es la menor resistencia de los quistes de *Naegleria* en comparación con los de *Acanthamoeba* que pueden permanecer viables, sobre todo, si tenemos en cuenta al estrés físico que se somete a estos microorganismos con el cloro y pH en las aguas recreativas (Górnik et al., 2004).

Otro aspecto muy importante a considerar cuando se estudian amebas de vida libre es su **relación con otros patógenos**, que son capaces de mantener en su interior y por lo tanto transportarlos y proporcionarles protección frente a los desinfectantes. Estos patógenos pueden ser tanto bacterias como virus, pero en el caso de este trabajo, solo se ha estudiado la presencia de bacterias y dentro de ellas se han seleccionado *Legionella*, *Mycobacterium spp*, *Pseudomonas* y cianobacterias, que son las que nos permite identificar con garantías la técnica desarrollada junto con el grupo de investigación de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza en 2013 (Calvo et al, 2013). Además, la presencia de bacterias en el agua de las piscinas se ha estudiado realizando el cultivo del agua y PCR para detectar *Legionella* y *Pseudomonas*.

Considerando la presencia o ausencia de bacterias endosimbiontes en las amebas de vida libre, estas fueron identificadas en el 56,4% de las muestras, no queriendo esto decir que las AVL que han dado resultado negativo se encuentren libres de bacterias, sino que pueden contener bacterias no pertenecientes a los 4 géneros que puede identificar la técnica utilizada.

Además, el porcentaje de positivos en las piscinas cubiertas es ligeramente inferior al de las piscinas al aire libre, aunque no resulta

significativo. A su vez destaca una mayor proporción de positivos en los vasos de piscinas recreativas (75%) en las piscinas cubiertas y de los vasos medianos en las piscinas al aire libre. No parece haber sin embargo, relación con el contenido en bacterias del agua, que se encuentra muy controlado como se puede observar en los resultados obtenidos en la sección correspondiente de los resultados, lo que sugeriría que las AVL captan estas bacterias en nichos ecológicos naturales y después son capaces de transportarlas en su interior a las piscinas, donde el contenido en cloro y el pH de las aguas no permite todavía su colonización.

El género que se encontró en una mayor proporción en el interior de las amebas fue *Legionella* (48,5%), seguida por *Pseudomonas* (39,4%) y por último *Mycobacterium* (12,1%). No se han encontrado cianobacterias en ningún caso de los estudiados.

Otros estudios realizados en España en embalses y plantas de tratamiento de agua, con una técnica igual a la utilizada en este trabajo (pentaplex-nested PCR) (García et al., 2013), obtuvieron *L. pneumophila* en el 13,9 % de los aislados, y *Pseudomonas spp.* y *Mycobacterium spp.* se detectaron en 32,6 % y 41,9 % respectivamente, datos similares a los obtenidos en este estudio, aunque en las aguas recreativas los valores más altos han sido para *Legionella*, seguido de *Pseudomonas* y *Mycobacterium* lo que pone de manifiesto que las amebas que transportaban *Legionella* han sido ligeramente más resistentes a los procesos de depuración que aquellas que transportaban *Pseudomonas* o *Mycobacterium*, y esto puede ser debido a la particular resistencia de las amebas huésped .

*Legionella spp.* se encuentra comúnmente en los ambientes acuáticos naturales y artificiales y son capaces de habitar en el interior de protozoos como las amebas principalmente, formando parte de los biofilms que constituyen la mayor fuente de contaminación para los humanos

(Murga et al., 2001; Kuiper et al., 2004; Declerck et al., 2007). La relación entre la presencia de *Legionella spp.* en el interior de los protozoos y la legionelosis humana ha sido demostrada en numerosos estudios (Harb et al., 2000; Al-Quadani et al., 2012; Renaud et al., 2013). La probabilidad de que estas bacterias fuesen miembros del género *Legionella*, fue confirmada por el análisis filogenético de su 16S ADNr (Newsome et al., 1998). Eran capaces de multiplicarse en los citoplasmas de las amebas pero no en los medios de cultivo específicos de *Legionella* y después de la lisis de los trofozoítos de ameba, las bacterias se mantuvieron viables durante al menos 7 días. Estas cepas fueron aisladas en Europa de fuentes ornamentales y de muestras clínicas (Rowbotham et al., 1993).

Son muy pocos los estudios que han comparado, las proporciones de *Legionella* intracelular y extracelular en el medio acuático. En el estudio de Kao et al., 2013, realizado en aguas termales de Taiwan, se obtuvo una tasa de detección global del 32 % para *Legionella spp.* intracelular y 12 % para extracelular. El hospedador de mayor prevalencia de *Legionella spp.* fue *Hartmannella vermiformis* coincidiendo con los resultados de este estudio (52,6% en *Hartmannella* frente a 18,8% en *Acanthamoeba*) (Kao et al., 2013). Si lo comparamos con los resultados del cultivo microbiológico del agua, realizado aquí, sería lo correspondiente al medio extracelular que resultaron ser todos negativos. Sin embargo, los resultados obtenidos con la técnica de PCR a partir del ADN amebiano, (lo que correspondería al medio intracelular de las amebas) resultó positivo el 36,2%. En ambos casos *Legionella spp.* identificada difiere sustancialmente entre las formas intracelulares y extracelulares, coincidiendo con lo comentado anteriormente del trabajo de Rowbotham et al., en 1993.

Las micobacterias no tuberculosas (MNT), son un grupo de bacterias distintas de *Mycobacterium tuberculosis* complejo, que son consideradas como patógenos oportunistas, aunque está en aumento los casos de

infecciones en individuos sanos (Thegerström et al., 2008). El hombre enfermo es el reservorio de las micobacterias pero desempeña un papel poco importante en la infección, siendo el medioambiente contaminado el reservorio principal y la fuente de infección, encontrándose en los alimentos, el suelo, el aire y principalmente el agua.

*Mycobacterium avium* es el bacilo responsable de enfermedades pulmonares y cutáneas. Ha sido investigada, con resultado positivo, la presencia de *M. avium* en piscinas y bañeras de hidromasaje (Manglione et al., 2001). Se han reportado casos de neumonitis granulomatosa, alveolitis pulmonar, neumonitis por hipersensibilidad causada por *Mycobacterium avium*, en los socorristas y trabajadores de instalaciones climatizadas (piscinas, bañeras de hidromasaje) al igual que en usuarios de piscinas con antecedentes de utilización de baños con aerosoles (Fujita et al., 2014; Moraga-McHaley et al., 2013; Sood et al., 2007; Kaschel et al., 2006).

La presencia *M. avium* y amebas de vida libre también se demostró en el agua de las piscinas de instalaciones, donde los trabajadores manifestaron neumonitis granulomatosa (Rose et al., 1998) y la capacidad de estos bacilos de crecer y sobrevivir en las amebas y otros protozoos (Cirillo et al., 1997; Falkinham 3rd, 2003).

En los resultados del presente estudio, la frecuencia de *Mycobacterium spp.* en el interior de las ambas es de 8,5%, mucho menor que el documentado en otros trabajos realizados en plantas de tratamiento de aguas (García et al., 2013), sin embargo, puede explicarse ya que la calidad del agua en la que se realiza el estudio es muy distinta y aunque *Mycobacterium* ha demostrado ser resistente al cloro (Taylor et al., 2000). Sí se observó sensibilidad, ya que disminuyó el porcentaje de bacterias conforme aumentaron las concentraciones de cloro, aunque no resultó estadísticamente significativo (<0,59 mg/l - 22,2% *Mycobacterium* positivo;

0,6 a 2mg/l- 6,5% *Myc.* Positivo; >2,1 mg/l- 0% *Myc.* Positivo), lo mismo sucedió al aumentar el pH.

La relación entre AVL y MNT, está todavía por aclarar. Existen pocos estudios que hayan investigado dicha relación. No se ha realizado hasta el momento ningún estudio que investigue la presencia de micobacterias en el interior de las AVL presentes en las muestras de agua de red, aunque sí se ha comprobado por fluorescencia, la internalización de mycobacterias en las AVL en cocultivo y su supervivencia en el interior como en el estudio de Ovrutsky et al., en 2013 o Berry et al., en 2010 (Ovrutsky et al., 2013; Berry et al., 2010). En el estudio de Ovrutsky et al., se comprobó que convivían en la red de agua ya que fueron aislados en diferentes puntos del circuito de agua de un hospital. Las AVL no aparecían colonizadas, pero también apuntan los autores que la técnica de cultivo podría interferir en la posterior identificación de MNT intaameba, aunque en el cultivo posterior sí se produjo la colonización. En el estudio citado también se demuestra, la mayor capacidad de un género sobre otro de albergar bacterias (*A. lenticulata* más que *Acanthamoeba* genotipo T4) y se sugiere que no está descrita la capacidad de *Hartmannella* de albergar MNT, sin embargo, en este estudio de los 4 aislamientos de *Mycobacterium* intaameba identificados, 2 se encontraron en el interior de *Hartmannella* y los otros 2 en otras amebas no descritas como causantes de enfermedad en el hombre (*Protacanthamoeba bohémica* y otra cuyo género no se identificó), pero en ningún caso en *Acanthamoeba*. Esto último refleja que aunque estas AVL no hayan sido descritas hasta el momento como patógenas, sí que pueden proteger a otros agentes patógenos o potencialmente patógenos e incluso transportarlos entre ecosistemas permitiéndoles, cuando las condiciones son propicias, causar enfermedad o colonizar otros nichos, como puede ser una conducción de agua o depósitos de agua potable a los que no deberían de haber llegado. La ameba no solo le confiere protección, ya que se ha

observado cómo se localizan las bacterias en el interior del quiste de la ameba (entre la doble pared), sino que además se ha comprobado en el trabajo de Cirillo et al., en 1997, como confiere esta asociación mayor virulencia a las bacterias (Stainert et al., 1998; Greub & Raoult 2004).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que con frecuencia se localiza en el agua de red y en aguas naturales. Es el agente causal más frecuente de foliculitis y otitis externa así como también de queratitis y neumonía. El riesgo que supone la presencia de estas bacterias en las piscinas fue demostrado en el estudio de Lutz & lee en 2011 donde obtuvieron una frecuencia del 21% de aislamientos de estas bacterias en aguas de piscinas cubiertas e hidromasaje, que resultaron ser resistentes a diversos antibióticos (Lutz & lee, 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares. Del total de los 49 vasos estudiados el 25,5% resultó positivo para *Pseudomonas* intraamebas aunque en los resultados del cultivo del agua (del estudio microbiológico) fue negativo en todos los vasos excepto en un vaso de hidromasaje y dos al aire libre. Esto sugiere, que el cultivo dio un falso negativo o que tal y como estamos demostrando, la bacteria se protege en el interior de las amebas. Al analizar los tres perfiles de *Pseudomonas*, según el cloro de la piscina, se comprueba que hay diferencias. Se observa que a medida que aumenta el nivel de cloro, aumenta el porcentaje de "Positivo". Se pasa de la ausencia de *Pseudomonas* en el nivel más bajo de cloro, al 29% en el nivel intermedio y casi al 43% en el nivel más alto. Si bien este resultado puede que no tenga ninguna relevancia ya que lógicamente, el cloro solo afecta a las bacterias libres en el agua.

La afinidad de la bacteria *Pseudomonas* y el género de AVL fue muy similar aunque la proporción de asociación entre *Pseudomonas-Acanthamoeba* supera en un 10% al de *Pseudomonas-Hartmannella*. Ambas



AVL han sido descritas como causantes de queratitis, aunque *Acanthamoeba* con mayor frecuencia. Se encuentra documentado (Dini et al., 2000; Iovieno et al., 2010; Hong et al., 2014) que una gran cantidad de las queratitis amebianas comienzan con una infección por *Pseudomonas* que no remite al erradicar esta bacteria mediante tratamiento antibiótico. La presencia de esta bacteria se traduce en una demora en el diagnóstico de la queratitis amebiana complicando más su tratamiento.

La identificación de 2 casos de asociación de micobacterias con *Pseudomonas* y *Legionella* en el interior de las amebas, apoyan la hipótesis de que los protistas pueden servir como una fuente y un lugar para la transferencia génica entre las bacterias intraamebas (*Hartmannella* y *Protacanthamoeba bohémica*) (Lamrabet et al., 2012).

Esto indica que las bacterias filogenéticamente y ecológicamente diversas que se encuentran en el interior de las amebas, desarrollan mecanismos comunes para la interacción con sus hospedadores, y apoya la teoría de que las amebas se comportan como “campos de entrenamiento” para los patógenos bacterianos de los seres humanos y a su vez, dentro de la ameba, se ha demostrado que las micobacterias están protegidas de los antibióticos y desinfectantes, tales como el cloro (Schmitz-Esser et al., 2010 ; HARRIFF Bermudez , 2009 ; Whan et al., 2006).

### **Otros parásitos**

El análisis por PCR de las muestras de agua tomadas dio como resultado el hallazgo de tres muestras positivas para *Giardia duodenalis* assemblage A y ninguna muestra dio positivo para *Cryptosporidium*. La presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium* puede ser indicativa de contaminación fecal, por lo que la ausencia de *Cryptosporidium* sugiere una buena calidad del agua, así como una buena higiene de los usuarios. No

ocurre en principio lo mismo con *Giardia*, pero hay un par de puntualizaciones a tener en cuenta: En primer lugar, las determinaciones se han realizado utilizando técnicas de Biología Molecular sobre una pequeña cantidad de agua, cuando se utilizan las técnicas clásicas se requiere la filtración de 100 litros de agua, lo que permite recuperar los quistes u oquistes y observar su posible viabilidad. Por otra parte una PCR positiva indica detección de ADN, pero esto no implica la presencia del parásito en situación viable, sino que en algún momento ha existido algún contacto con el parásito. De hecho, llama la atención la identificación de ADN correspondiente a *Giardia* assemblage AI, ya que en estudios anteriores realizados en la Zaragoza muestran la presencia mayoritaria de un genotipo circulante B mayoritario, y en ocasiones (no siempre) de un genotipo All minoritario. El genotipo AI solo ha sido descrito en animales hasta la fecha y en fangos de depuradora (Goñi et al., 2010 y Marin et al, in press)

En el trabajo realizado por Goñi et al., en 2010, estudiaron los genotipos *Giardia* en muestras de heces de pacientes en las ciudades de Zaragoza y León, resultado el genotipo B como el más frecuente en ambos casos. Resultado que difiere de nuestro estudio donde el genotipo A es el único detectado. Esto sugiere la presencia en el agua de ADN de *Giardia* procedente de animales, aunque este parásito no se encuentre viable.

En otro trabajo, se estudió la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en plantas de tratamiento de agua (Nishi et al., 2009). En el agua sin tratar se detectó *Cryptosporidium* en el 26,65% de las muestras y 6,6% de *Giardia* mientras que en las aguas tratadas el resultado fue negativo en ambos casos, resultado que difiere con lo obtenido en las piscinas estudiadas, lo que nos sugiere es que si en el agua tratada hay ausencia de éstos parásitos, el portador en este caso tiene que ser humano pero sin embargo, el número

de estudios que identifican *Cryptosporidium* y *Giardia* en el agua de red previamente tratada, son numerosos.

Además en 7 casos se dio crecimiento de **nematodos**, como resultado de la presencia de huevos en el agua. Aparecen en piscinas cubiertas, hidromasajes o jacuzzis en los que la temperatura del agua es más adecuada para su conservación. Sin embargo, la identificación molecular de las larvas indica su pertenencia a géneros de vida libre que se alimentan de bacterias y que por lo tanto no suponen un riesgo para la salud. Su origen puede ser las conducciones de agua. Cuando esto ocurrió el personal responsable fue advertido y se procedió a la limpieza de la instalación y la sustitución del agua.

### C. MUESTRAS CLÍNICAS

Además de las muestras procedentes de agua, se estudiaron una pequeña cantidad de muestras clínicas procedentes de pacientes con queratitis, usuarios de lentes de contacto. Todas ellas pertenecieron al genotipo T4 como se ha descrito en la mayoría de los casos (Hong et al., 2014; Arnalich-Montil et al., 2014; Ledee et al., 2009; Dini et al., 2000), aunque no hubo una gran homología entre ellas, siendo la mayor la encontrada entre las cepas M1 y MC3 (95,3%) y PALG y MC4 con un 98%.

Si comparamos entre sí todas las cepas de *Acanthamoeba* identificadas en el estudio: aguas de red, piscinas y muestras clínicas y como se comenta en la sección D de resultados, la homología máxima de las cepas aisladas en las piscinas cubiertas con las de agua de red o las clínicas es del 97.4%, lo que implica que no se puede asegurar con certeza que sean la misma cepa, ya que esto requeriría una homología del 100%, pero sí que indica que existe una relación epidemiológica entre ellas.

Sí que se obtienen identidades, cuando las cepas comparadas son las procedentes de piscinas al aire libre, en que la misma cepa se encuentra en dos fuentes, una planta depuradora y varios vasos de diferentes piscinas, situadas en diferentes puntos de la ciudad y una de las cepas clínicas. Además, cepas aisladas en puntos muy próximos geográficamente y que comparten importantes tramos de conducciones de agua, presentan una homología del 94.6% que indica relación epidemiológica. Esto refuerza la idea de que la ameba vive en todo el ciclo del agua, sobrepasa el EDAR (plantas de tratamiento de aguas residuales) y las potabilizadoras, las depuradoras de agua de las piscinas y coloniza por tanto las conducciones de agua y a través de estas entra en contacto con los ojos de los pacientes provocando la infección.

También hay que tener en cuenta que el volumen de agua recogido, aunque pequeño, permite evaluar el riesgo para la salud ya que las amebas que se aíslan son aquellas que se encuentran libres o en gran concentración, no pudiendo identificar todas las que se encuentran integradas en biofilms, colonizando las tuberías de distribución de agua. Dicho riesgo queda demostrado cuando la ameba que se encuentra en más localizaciones, representada por la ameba P31F, es capaz de producir infección "*in vivo*".

Dado que la erradicación de las AVL es imposible, dada su condición de microorganismo ubicuo y medioambiental, y por lo tanto el contacto con ellas es inevitable, sí que se recomienda adoptar medidas preventivas en aquellos casos en que personas susceptibles vayan a practicar inmersiones en lugares que puedan contener estas amebas como las piscinas, ya sean cubiertas o al aire libre.

## **VI. CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

---

1. Se encuentra una menor frecuencia en el aislamiento de AVL en el agua de consumo particular que en la destinada a otros servicios públicos, poniendo de manifiesto el posible papel de las redes de distribución en la colonización y mantenimiento de estos microorganismos, así como el mejor estado de las redes de distribución de estas instalaciones y la necesidad de tener en cuenta aspectos como la mejora de la estructura y calidad de los materiales destinados a dichos sistemas, para el control de las poblaciones de AVL.
2. En las muestras estudiadas de agua de red, la moderadamente alta frecuencia de aislamiento de *Hartmannella vermiformis* (en la actualidad *Vermamoeba vermiformis*), *Acanthamoeba* genotipos T4, T15 y T11, junto con una cepa de *Paravahlkampfia*, todas ellas descritas como potencialmente patógenas, implica riesgo de adquisición de queratitis a través del agua doméstica. Especial cuidado deben prestar las personas portadoras de lentes de contacto que deben evitar el contacto tanto de la lente, los estuches de las lentes como del ojo con alguna lesión corneal, con el agua de red. No se han detectado *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria o Sappinia pedata*, debido a que la metodología utilizada no lo permite, por lo que no es posible evaluar el riesgo de transmisión de enfermedades del SNC.

3. El 50% de las amebas de la red pública estudiadas, presentan en su interior bacterias patógenas de los géneros *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium spp*, a las que confieren protección frente a los desinfectantes, además de favorecer su multiplicación. Por ello, se considera que existe un riesgo de infección por estos patógenos, en especial para personas inmunodeprimidas, y se recomienda el control de las poblaciones de AVL en las conducciones de agua de instituciones como hospitales donde contribuiría a la disminución del número de infecciones nosocomiales. En el momento de realización del estudio no se encontraron ni *Legionella* ni cianobacterias tóxicas como bacterias endosimbiontes, no pudiendo asegurar su ausencia en todo momento.
4. Se demuestra la presencia de bacterias endosimbiontes potencialmente patógenas por primera vez en géneros de AVL no descritas como patógenas, lo que pone de manifiesto su capacidad como fuentes de transmisión y diseminación de patógenos.
5. Se ha encontrado una alta frecuencia (83,7%) de vasos que contienen amebas de vida libre en las piscinas públicas de la zona urbana de Zaragoza, lo que supone un riesgo para la salud, siendo este mayor en las instalaciones al aire libre que en las cubiertas, en las recreativas y pequeñas y en el punto superior de muestreo. Esto sugiere un papel importante del medioambiente y los usuarios en la contaminación de las piscinas con amebas, por lo que se deben seguir exigiendo las medidas higiénicas, como la ducha previa al acceso al vaso y la prohibición del acceso con calzado.

6. La alcalinización del agua reduce moderadamente la proporción de AVL, no así el aumento de los valores de cloro que no impide el aislamiento de cepas potencialmente patógenas.
7. En las piscinas estudiadas se han aislado amebas de los géneros *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y otros géneros considerados como no patógenos. No se ha detectado *Naegleria fowleri*, y las técnicas utilizadas no permiten la identificación de *Balamuthia mandrillaris* o *Sappinia pedata*. El genotipo de *Acanthamoeba* más frecuentemente aislado fue el genotipo T4.
8. Se ha demostrado la virulencia de una cepa de *Acanthamoeba* aislada en una piscina al aire libre, que no demostró crecimiento a 42°C ni alta osmotolerancia, factores de virulencia considerados como imprescindibles por otros autores, sugiriendo por una parte la existencia de riesgo de adquisición de infecciones oculares y por lo tanto la necesidad de informar a los usuarios con factores de riesgo de la necesidad de utilizar medios de prevención, y por otra la necesidad de continuar investigando los factores de virulencia que propician las infecciones por *Acanthamoeba* y que puedan ser utilizados como marcadores.
9. Se han detectado bacterias endosimbiontes en una alta proporción (56,4%) de las AVL aisladas en las piscinas, siendo esta ligeramente mayor en las piscinas al aire libre que en las cubiertas. La más identificada ha sido *Legionella*, seguida por *Pseudomonas* y *Mycobacterium*, no existiendo asociación con la presencia de estas bacterias en el agua del vaso de la piscina, que en todos los casos ha mostrado un buen estado a nivel bacteriológico, sin riesgos para la salud y cumpliendo con las normas indicadas en el Real decreto de control de medidas higiénicas en las



piscinas de 2003 (actualizado en 2013 y 2014). Esto sugiere que las bacterias han sido internalizadas por las AVL en puntos anteriores del ciclo del agua y las han protegido de las sucesivas desinfecciones sufridas hasta llegar a la piscina, así como de los niveles de cloro presentes en estas.

10. Se ha detectado en vasos ADN de *Giardia duodenalis* assemblage AI, no encontrado en humanos en el área geográfica estudiada y no habiendo podido demostrar la presencia de quistes viables, lo que indica la ausencia de riesgo de adquisición de enfermedades producidas por este parásito. Tampoco se ha detectado presencia de ADN u ooquistes viables de *Cryptosporidium*.
11. Las identidades y las altas homologías encontradas entre las secuencias obtenidas para las cepas de *Acanthamoeba* aisladas en muestras de red en piscinas y en muestras clínicas, pone de manifiesto el papel de las redes de distribución en la colonización y mantenimiento de las poblaciones de AVL, así como la necesidad de considerar estas poblaciones en el caso de aparición de brotes producidos por sus bacterias endosimbiontes.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abd El-Salam MM. Assessment of water quality of some swimming pools: a case study in Alexandria, Egypt. *Environ Monit Assess.*2012;184(12): 7395-406.
2. Abd H, Wretlind B, Saeed A, Idsund E, Hultenby K, Sandström G. *Pseudomonas aeruginosa* utilises its type III secretion system to kill the free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol.*2008;55(3):235-43.
3. Abedkhozasteh H, Niyayati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M. First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iran J Parasitol.*2013;8(3):481-5.
4. Adékambi T, Ben Salah S, Khelif M, Raoult D, Drancourt M. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol.*2006;72(9):5974-81.
5. Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol.*2002;88(3):621-3.
6. Alio JL, Abbouda A, Valle DD, Del Castillo JM, Fernandez JA. Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. *J Ophthalmic Inflamm Infect.*2013;29;3(1):47.
7. Al-Quadani T, Price CT, Abu Kwaik Y. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* 2012; 20:299–306

8. Anderson, O Roger. Protozoan Ecology. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2010. disponible en: <http://www.els.net>
9. Aqeel Y, Siddiqui R, Khan NA. Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii*. Parasitol Res. 2013;112(3):1221-7
10. Alizadeh H, S. Apte S, El-Agha M.S., Li L., Hurt M., Howard K., Cavanagh H.D., McCulley J.P., Niederkorn J.Y. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. Cornea. 2001;20(6):622-7.
11. Arance-Gil A, Gutiérrez-Ortega AR, Villa-Collar C, Nieto-Bona A, Lopes-Ferreira D, González-Méijome JM. Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. Cont Lens Anterior Eye. 2013; Dec 16. pii: S1367-0484(13)00313-5.
12. Arias Fernández MC, Paniagua Crespo E, Marti Mallen M, Penas Ares MP, Casro Casas ML. Marine amoebae from waters of northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. J Protozool. 1989; 36(3):239-41.
13. Arnalich-Montiel F, Lumbreras-Fernández B, Martín-Navarro CM, Valladares B, Lopez-Velez R, Morcillo-Laiz R, Lorenzo-Morales J. Influence of *Acanthamoeba* genotype on clinical course and outcomes for patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. J Clin Microbiol. 2014;52(4): 1213-6.
14. Axelsson-Olsson D, Olofsson J, Svensson L, Griekspoor P, Waldenström J, Ellström P, Olsen B. Amoebae and algae can prolong the survival of *Campylobacter* species in co-culture. Exp Parasitol. 2010; 126(1): 59-64.

15. Axelsson-Olsson D, Waldenström J, Broman T, Olsen B, Holmberg M. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.*2005;71(2): 987-92.
16. Bandyopadhyay P, Byrne B, Chan Y, Swanson MS, Steinman HM. *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. *Infect Immun.*2003;71(8): 4526-35.
17. Barbeau J, Buhler T. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Research in Microbiology.*2001;152 (8):753-760.
18. Barker J, Brown MR. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology.*1994;140 (6):1253-9.
19. Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis.*1996;174(1): 233-6.
20. Ben Salah I, Ghigo E, Drancourt M. Free-living amoeba, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect.*2009;15: 894–905.
21. Bernauer W, Duguid GI, Dart JK. Zur klinischen Frühdiagnose der *Acanthamoeben*-Keratitis: Eine Studie über 70 Augen. *Klin Monatsbl Augenheilkd.*1996;208(5):282- 284.
22. Berry D, Horn M, Xi C, Raskin L. *Mycobacterium avium* infections of *Acanthamoeba* strains: host strain variability, grazing-acquired infections, and altered dynamics of inactivation with monochloramine. *Appl Environ Microbiol.*2010;76(19): 6685-8.
23. Bertino JS. Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics. *Clin Ophthalmol.*2009;3:507–521.

24. Bertrand I, Schwartzbrod J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. *Water Res.*2007;41(16):3675-82.
25. Betanzos-Cabrera G, Juarez-Verdayes MA, Gonzalez-Gonzalez G, Cancino- Diaz ME, Cancino-Diaz JC. Gatifloxacin, moxifloxacin, and balofloxacin resistance due to mutations in the *gyrA* and *parC* genes of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with endophthalmitis, corneal ulcers and conjunctivitis. *Ophthalmic Res.*2009;42:43–48
26. Bialasiewicz AA, Bischoff G, Walter A, Engelmann K, Richard G. Correlation of 55 samples of contact lens fluid and direct swabbings of the eye surface of symptomatic wearers of contact lenses. *Ophthalmologie.*2001; 98(8):747-60.
27. Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista GA, Zamora-Muñoz C, Ibarra-Montes Mdel R, Ramírez-Flores E, Hernández-Martínez MD. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp Parasitol.*2010;126(1):54-8.
28. Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DS, Byers TJ, Fuerst PA. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol.*2002;40(5):1621-5.
29. Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol AnnuRev.*2005;11:355-380.
30. Bowers B, Korn ED. Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol.*1973;59:784–91.

31. Bradbury RS, French LP, Blizzard L. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. *J Hosp Infect.*2014;86(3):178-81.
32. Brindley N, Matin A, Khan NA: *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations.*Expe Parasitol.*2009;121:254-6.
33. Bryant, K. *Acanthamoeba* keratitis – multiple statesMMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.2007;1:532–534.
34. C.F. Radford, D.C. Minassian, Dart J.K.G. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol.*2002;86:536–542.
35. Cacciò SM. New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parassitologia.*2004;46(1-2):151-5.
36. Calvo L, Gregorio I, García A, Fernández MT, Goñi P, Clavel A, Peleato ML, Fillat MF. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. *Water Res.*2013;47(2):493-502.
37. Cañete R, González ME, Almirall P, Figueroa I. *Giardia* infection and Giardiasis. *Rev Panam Infectol.*2004;6(3):41-48.
38. Carter RF. Primary Amoebic Meningo-Encephalitis. An Appraisal of Present Knowledge. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*1972;66:193-213.
39. Castrillón JC, Orozco LP. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Rev Chilena Infectol.*2013;30(2):147-55.
40. Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon AP, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol.*2009;103(6):477-85.
41. Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop.*2011;117(3):233-5.

42. Chalmers RM. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann Ist Super Sanita*.2012;48(4):429-4.
43. Chávez-Munguía B, Omaña-Molina M, Castañón G, Bonilla P, González-Lázaro M, Hernández-Martínez D, Salazar-Villatoro L, Esparza-García A, Martínez-Palomo A, Ortega-Pierres G. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *J Eukaryot Microbiol*.2009;56(1):66-72.
44. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*.1997;65:3759–67.
45. Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.2004;242(8):648-53.
46. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol*.2006;22:175–180
47. Corsaro D, Venditti D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res*.2010; 107(1):233-8.
48. Coşkun KA, Özçelik S, Tutar L, Elaldı N, Tutar Y. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int*.2013;2013:675145.
49. Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol*.2010;48(8):2689-97.
50. Cuevas PM, Smoje PG, Jofre ML, Ledermann DW, Noemi HI, Berwart CF, Latorre LJJ, Gonzales BS: Granulomatous amoebic meningoencephalitis by *Balamuthia mandrillaris*: case report and literature review. *Rev Chilena Infectol*.2006;23(3):237-242.



51. Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., and Overton, W.M. The isolation of additional strains of pathogen *Hartmannella* sp. (*Acanthamoeba*): proposed culture method for application to biological material. *Am J Clin Pathol.*1965;43: 383–387.
52. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun.*1980;29:401-7.
53. De Jonckheere JF, Brown S. Is the free-living ameba *Hartmannella* causing keratitis? *Clin Infect Dis.*1998;27(5):1337-8.
54. De Jonckheere JF, Brown S. There is no evidence that the free-living ameba *Hartmannella* is a human parasite. *Clin Infect Dis.*1998;26(3):773.
55. De Jonckheere JF. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist.*2004;155(1):89-103.
56. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol.*2011;11(7):1520-8.
57. De Jonckheere JF. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann Microbiol (Paris).*1979;130B(2):205-12.
58. De Jonckheere, J.F. Geographic origin and spread of pathogenic *Naegleria fowleri* deduced from restriction enzyme patterns of repeated DNA. *Biosystems.*1988;21:269–275.
59. De Jonckheere. J.F. Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from keratitis cases in Belgium. *Bull Soc Belge Ophtalmol.*2003;(287):27-33.
60. DeLong, E.F. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5685-5689.

61. Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res.*2007;41(14):3159-67.
62. DECRETO 50/1993, de 19 de mayo, de la Diputación General de Aragón, por el que se regulan las condiciones higiénico-sanitarias de las piscinas de uso público. Departamento de Salud y Consumo. 2009.  
Disponible en:  
<http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SaludConsumo/Documentos/docs/Profesionales/Legislacion/> [Consultado 20 de diciembre de 2011]
63. Del Buey MA, Cristóbal JA, Casas P, Goñi P, Clavel A, Mínguez E, Lanchares E, García A, Calvo B. Evaluation of in vitro efficacy of combined riboflavin and ultraviolet a for *Acanthamoeba* isolates. *Am J Ophthalmol.*2012;153(3):399-404.
64. Dendana F, Sellami H, Trabelsi H, Neji S, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. *Acanthamoeba* T4 genotype associated with keratitis infections in Tunisia. *Parasitol Res.*2013;112(1):401-5.
65. Dendana F, Sellami H, Jarraya F, Sellami A, Makni F, Cheikhrouhou F. Free-living amoebae: Detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an hemodialysis unit in Tunisia. *Parasite.*2008;15:137–42.
66. Derr-Harf C, Molet B, Schreiber J, Kremer M. Epidemiology of free-living amoebae in the waters of Strasbourg (France) (author's transl). *Ann Parasitol Hum Comp.*1978;53(5):467-77.
67. Di Cave D, D' Alfonso R, Dussey Comlavi KA, D' Orazi C, Monno R, Berrilli F. Genotypic heterogeneity based on 18S-rRNA gene sequences among *Acanthamoeba* isolates from clinical samples in Italy. *Exp Parasitol.*2014; S0014-4894(14)00123-4.

68. Di Cave D, Monno R, Bottalico P, Guerriero S, D'Amelio S, D'Orazi C, Berrilli F. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*2009;28(6):607-12.
69. Dini LA, Cockinos C, Frea JA, Niszl IA, Markus MB. Unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a contact lens wearer from Gauteng, South Africa. *J Clin Microbiol.*2000;9(2):826–829.
70. Donlan RM, Forster T, Murga R, Brown E, Lucas C, Carpenter J, Fields B. *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling.*2005;21(1):1-7.
71. Douesnard-Malo F, Daigle F. Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol.*2011;77(21):7640-6.
72. Drancourt M, Adékambi T, Raoult D. Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells. *J Hosp Infect.*2007;65(2):138-42.
73. Drozanski W., Chmielewski T. Electron microscopic studies of *Acanthamoeba castellanii* infected with obligate intracellular bacterial parasite. *Acta Microbiol Pol.*1979;28:123–133.
74. Drozanski W., Drozanska D. Dead bacteria as a food for Amoebae. *Acta Microbiol Pol.*1961;10:379–387.
75. Dudley R., Alsam S., Khan N. A. (2008), The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Letters.*2008; 286:9–15.
76. Dutta D, Cole N, Willcox M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. *Mol Vis.*2012;18:14-21.

77. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhaara Y, Karanis P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res.*2009;105(4):1109-17.
78. Ettinger MR, Webb SR, Harris SA, McIninch SP, Garman G, Brown BL. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res.*2003;89:6–15.
79. Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology.*1993;106(Pt 4):347-56.
80. Falkinham JO 3rd. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis.*2003;9(7):763-7.
81. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.*2002;15(3):506-26.
82. Fowler, M., Carter, R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: a preliminary report. *Br. Med. J.* 1965;2:740–743.
83. Fujita K, Ito Y, Hirai T, Kubo T, Maekawa K, Togashi K, Ichiyama S, Mishima M. Association between polyclonal and mixed mycobacterial *Mycobacterium avium* complex infection and environmental exposure. *Ann Am Thorac Soc.*2014;11(1):45-53.
84. Galarza C, Ramos W, Gutierrez E. L, Ronceros G, Teran M, Uribe, Ñavincopa M, Ortega-Loayza A. G. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *International Journal of Dermatology.*2009;48:1324–1329.
85. Galván AL, Magnet A, Izquierdo F, Fernández Vadillo C, Peralta RH, Angulo S, Fenoy S, del Aguila C. A year-long study of *Cryptosporidium*

species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Sci Total Environ.* 2014;468-469:368-75.

86. Garcia A, Goñi P, Cieloszyk J, Fernandez MT, Calvo-Beguería L, Rubio E, Fillat MF, Peleato ML, Clavel A. Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol.* 2013;47(7):3132-40

87. García A, Goñi P, Clavel A, Lóbez S, Fernández MT, Ormad MP. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ Microbiol Rep.* 2011;3(5):622-6.

88. Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43(6):498-504.

89. Gast RJ. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48(6):609-15.

90. Gelman B B, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf S J, Nauta H W, Visvesvara G S. Neuropathological and ultrastructural features of amoebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62: 990-8.

91. Gelman B B, Rauf S J, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, Nauta H W, Visvesvara GS. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA.* 2001;16;285:2450-1.

92. Gianinazzi C, Schild M, Wüthrich F, Ben Nouir N, Fuchsli HP, Schürch N, Gottstein B, Müller N. Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Res Microbiol.* 2009;160(6):367-74.

93. Gianinazzi C, Schild M, Zumkehr B, Wüthrich F, Nüesch I, Ryter R, Schürch N, Gottstein B, Müller N. Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp Parasitol.*2010;126(1):45-53.
94. Goldschmidt P, Degorge S, Saint-Jean C, Yera H, Zekhnini F, Batellier L, Laroche L, Chaumeil C. Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. *Br J Ophthalmol.*2008; 92(1):112-5. Erratum in: *Br J Ophthalmol.* 2009; 93(3):418. Year, H [corrected to Yera, H].
95. Goñi P, Aldana DE, Clavel A, Seral C, Remacha MA, Castillo FJ. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B in humans in Zaragoza and León, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*2010;28(10):710-2.
96. Goñi P, Fernández MT, Rubio E. Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae. *Environ Microbiol.*2014;16(2):339-49.
97. González de la Cuesta N, Arias- Fernández M<sup>a</sup>C, Paniagua-Crespo E, Marti-Mallen M. Presencia de amebas de vida libre en aguas de piscinas de Galicia (España).*Rev. Iber. Parasitol.* 1987;47(3):207-210.
98. Gorlin AI, Gabriel MM, Wilson LA, Ahearn D.G. Effect of adhered bacteria on the binding of *Acanthamoeba* to hydrogel lenses. *Arch. Ophthalmol.*1996; 114:576-80.
99. Górník K, Kuźna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med.*2004;11(2):233-6.
100. Górník K. Pathogenic properties of free-living amoebae isolated from natural and man-made bathing sites in the province of Western Pomerania. *Ann Acad Med Stetin.*2005;51(1):127-33.
101. Gotuzzo E, Cabrera J, Bravo F, Velarde C, Delgado W, Echevarria J, Chaparro E, Campos P, Cok J, Recavarren S, Visvesvara G. Infection by

- Balamuthia mandrillaris*. Report of 30 cases at the Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Peru. Abstract 18.005. 9th International Congress of Infectious Diseases, Buenos Aires, Argentina.2000.
102. Goudot S, Herbelin P, Mathieu L, Soreau S, Banas S, Jorand F. Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Res.* 2012;46(13):3958-66.
103. Graffi S, Peretz A, Jabaly H, Koiefman A, Naftali M *Acanthamoeba* keratitis: study of the 5-year incidence in Israel *Br J Ophthalmol.*2013; 97(11):1382-3.
104. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev.*2004;17:413–433.
105. Gupta N, Bhaskar H, Duggal S, Ghalaut PS, Kundra S, Arora DR. Primary amoebic meningoencephalitis: first reported case from Rohtak, North India. *Braz J Infect Dis.*2009;13(3):236–7.
106. Harb OS, Gao LY, Abu Kwaik Y. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol.*2000;2(3):251-65.
107. Harriff M, Bermudez LE. Environmental amoebae and mycobacterial pathogenesis. *Methods Mol Biol.*2009;465: 433-42.
108. Havelaar AH, Berwald LG, Groothuis DG, Baas JG. Mycobacteria in semi-public swimming pools and whirlpools. *Zentralbl Hyg Umweltmed.*1985;180:505–14.
109. Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool.*2003;42:325–329.
110. Hlavsa MC, Roberts VA, Kahler AM, Hilborn ED, Wade TJ, Backer LC, Yoder JS; Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Recreational water-associated disease outbreaks--United States, 2009-2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.2014;63(1):6-10.

111. Hoffmann R, Michel R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. Int J Hyg Environ Health.2001;203(3): 215-9.

112. Hong J, Ji J, Xu J, Cao W, Liu Z, Sun X. An unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. Diagn Pathol.2014; 9:105.

113. Hong J, Xu J, Hua J, Sun X. Bacterial keratitis in Shanghai. Ophthalmology. 2013;120(3):647.

114. Horn M, Fritsche TR, Gautam RK, Schleifer KH, Wagner M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. Environ Microbiol.1999;1(4):357-67.

115. Huang SW, Hsu BM. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. Acta Trop.2010;115(3):282-7.

116. Hurst CJ, Clark RM, Regli SE. Part 2. Preventing disease transmission by water and food. 2. Estimating the risk of acquiring infectious disease from ingestion of water. In: Hurst CJ (ed.). Modeling disease transmission and its prevention by disinfection. Cambridge: Cambridge University Press;1996.p. 408.

117. Init I, Lau YL, Arin Fadzlun A, Foad AI, Neilson RS, Nissapatorn V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. Trop Biomed.2010;27(3):566-77.

118. Iovieno A, Oechsler RA, Ledee DR, Miller D, Alfonso EC. Drug-resistant severe *Acanthamoeba* keratitis caused by rare T5 *Acanthamoeba* genotype. Eye Contact Lens.2010;36(3):183-4.



119. Janitschke K, Werner H, Müller G. Examinations on the occurrence of free-living amoebae with possible pathogenic traits in swimming pools (author's transl). *J Clin Microbiol.*2010;48(8):2689-97.
120. Jasim H, Knox-Cartwright N, Cook S, Tole D. Increase in *Acanthamoeba* keratitis may be associated with use of multipurpose contact lens solution. *BMJ* 2012; 344:p. e1246.
121. Jeon, K.W., and Lorch, I.J. Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Exp Cell Res.*1967;48:236–240.
122. Johnson, A.M., Fielke, R., Christy, P.E., Robinson, B., and Baverstock, P.R. Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *J Gen Microbiol.*1990;136:1689–1698.
123. Kahane S, Platzner N, Dvoskin B, Itzhaki A, Friedman MG. Evidence for the presence of *Simkania negevensis* in drinking water and in reclaimed wastewater in Israel. *Appl Environ Microbiol.*2004;70(6):3346-51.
124. Kao PM, Tung MC, Hsu BM, Hsu SY, Huang JT, Liu JH, Huang YL. Differential *Legionella* spp. survival between intracellular and extracellular forms in thermal spring environments. *Environ Sci Pollut Res Int.*2013;20(5):3098-106.
125. Kashiwabuchi RT, Carvalho FR, Khan YA, Hirai F, Campos MS, McDonnell PJ. Assessment of fungal viability after long-wave ultraviolet light irradiation combined with riboflavin administration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 201;251(2):521-7
126. Kelly LD, Xu L. The effect of concurrent *Pseudomonas* or *Xanthomonas* exposure on adherence of *Acanthamoeba castellanii* to soft contact lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*1996;234:311-4.

127. Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.*2002;45(3):197-202.
128. Khan NA, Jarroll EL, Panjwani N, Cao Z & Paget TA. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol.*2000;38:2858–2861.
129. Khan NA, Siddiqui R. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. *Parasitology.*2014;5:1-6.
130. Khan NA, Tareen NK. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorization of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol (Praha).*2003;50:97–104.
131. Khan NA. *Acanthamoeba* spp. In: Khan NA, ed. Emerging protozoan pathogens. Taylor and Francis Group: New York.2008:3–56.
132. Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD. *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J Infect.*1998;36(1):43-8.
133. Kilvington, S., Beeching, J.R., and White, D.G. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J Clin Microbiol.*1991;29:310–314.
134. Kliescikova, J. Kulda J, Nohynkova E. Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. *Exp. Parasitol.*2011;127:326–328
135. Knickelbein JE, Kovarik J, Dhaliwal DK, Chu CT. *Acanthamoeba* keratitis: a clinicopathologic case report and review of the literature. *Hum Pathol.*2013;44(5):918-22.
136. Koschel D, Pietrzyk C, Sennekamp J, Müller-Wening D. Swimming pool lung -- extrinsic allergic alveolitis or mycobacterial disease?. *Pneumologie.*2006;60(5):285-9.

137. Kowalski RP, Abdel Aziz S, Romanowski EG, Shanks RM, Nau AC, Raju LV. Development of a Practical Complete-Kill Assay to Evaluate Anti-*Acanthamoeba* Drugs. *JAMA Ophthalmol.*2013;131(11):1459-62.
138. Kranjčić-Zec I, Šćepan L, Mitrović S. Free living amoebae of the *Acanthamoeba* genus--investigations made in recreation centres of the city of Belgrade. *Srp Arh Celok Lek.*1991;119(11-12):293-6.
139. Ku JY, Chan FM, Beckingsale P. *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. *Clin. Exp. Ophthalmol.*2009; 37,181–190.
140. Kuhlencord A, Mergerian H, Bommer W: Studies on the pathogenesis of *Acanthamoeba*-associated meningoencephalitis. *Zentralbl Bakterio.*1989;271,256-260.
141. Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans AD, Beumer RR, van der Kooij D. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol.*2004;70(11):6826–6833.
142. Cerva L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*1989;33:pp.99–103
143. Lamrabet O, Merhej V, Pontarotti P, Raoult D, Drancourt M. The Genealogic Tree of Mycobacteria Reveals a Long-Standing Sympatric Life into Free-Living Protozoa. *PLoS ONE* .2012;7(4): e34754.
144. Lau HY, Ashbolt NJ. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol.*2009 Aug;107(2):368-78. Review
145. Lavado Landeo L. Diagnosis and treatment of keratitis *Acanthamoeba*. *Rev Horiz Med.*2012;vol 12(4).

146. Ledee DR, Iovieno A, Miller D, Mandal N, Diaz M, Fell J, Fini ME, Alfonso EC. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1458-62.
147. Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR, Russell AD. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48(1):11-6.
148. López-Cerero L, Etxebarria J, Mensa J. Microbiological diagnosis of ocular infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;Nov;27(9):531-5.
149. Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res.* 2007;102(1):167-9
150. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol.* 2013;29(4):181-7.
151. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Santana-Morales MA, Afonso-Lehmann RN, Maciver SK, Valladares B, Martínez-Carretero E. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5151-5.
152. Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jiménez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega-Rivas A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med.* 2005;12(2):233-6
153. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba*

strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res.*2005;95(4):273-7.

154. Lorenzo-Morales J1, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol.*2013;29(4):181-7.

155. Loret JF, Jousset M, Robert S, Saucedo G, Ribas F, Thomas V, Greub G. Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. *Water Sci Technol.*2008;58(3):571-7.

156. Lutz JK, Lee J. *Prevalence and antimicrobial-resistance of Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(2):554-64.

157. Martín Delgado MM, Pita ML. Plan Nacional de salud y medio Ambiente. Informe:aguas y Salud Pública. Resumen ejecutivo. Toledo Diciembre de 2007. Disponible en: <https://www.msssi.gob.es>

158. Madrigal Sesma MJ, Santillana López I. [Health study of swimming pools in Madrid]. *Rev Sanid Hig Publica.*1985;59(9-10):1117-24

159. Madrigal Sesma MJ. Isolation of free-living amoebae, potentially pathogenic for humans, from 3 species of saurians from the western Canary Islands. *Rev Sanid Hig Publica.*1988;62(1-4):1405-9.

160. Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol.*2005;54(Pt 8):755-9.

161. Magnet A, Fenoy S, Galván AL, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, Del Aguila C. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res.*2013;47(19):6966-72.

162. Mangione EJ, Huitt G, Lenaway D, Beebe J, Bailey A, Figoski M, et al. Nontuberculous mycobacterial disease following hot tub exposure. *Emerg Infect Dis.*2001;7:1039–42.10.
163. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.*2003;16:273–307.
164. Marciano-Cabral F, Cabral G. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.*2007; 51:243–59.
165. Marciano-Cabral F, Puffenbarger R, Cabral GA. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J Eukaryot Microbiol.*2000;47(1):29-36.
166. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.*1997; 7:583–98.
167. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(12):2885-93.
168. Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol.*2009;201:71-115.
169. Mergeryan H. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev Infect Dis.*1991;13(Suppl. 5):S390–1.
170. Michel R, Schneider H. Studies of limax-amoebae in a physiotherapeutical indoor-swimming-pool (author's transl). *Zentralbl Bakteriol B.*1980;170(5-6):479-91.
171. Moliner C, Fournier PE, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34:281–294.
172. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.*1999;16(9):1135-44.

173. Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology*.1996;112( Pt 1):1-12.
174. Moraga-McHaley SA, Landen M, Krapfl H, Sewell CM. Hypersensitivity pneumonitis with *Mycobacterium avium* complex among spa workers. *Int J Occup Environ Health*.2013;19(1):55-61.
175. Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*.2001;147(Pt 11):3121-6
176. Navarro-i-Martinez L, del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(2):135-43
177. Neff RJ, Neff RH. The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol*.1969;23:51-81.
178. Newsome AL, Scott TM, Benson RF, Fields BS. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(5):1688-93.
179. Nicolas M, De Jonckheere JF, Pernin P, Bataille H, Le Bris V, Herrmann-Storck C. Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies). *Bull Soc Pathol Exot* .2010;103(1):14–8.
180. Nishi L, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P, Falavigna DL, Falavigna-Guilherme AL. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. *Zoonoses Public Health*.2009 Jun;56(5):221-8.
181. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from

- environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. J Clin Microbiol. 2010;48(12):4636-40.
182. Oddó B David. Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. Rev. chil. infectol. 2006;23(3):200-214.
183. Ovrutsky A R, Chan E D, Kartalija M, Bai X, Jackson M, Gibbs S, Falkinham J O, III, Iseman M D, Reynolds P R, McDonnell G, Thomas V. Cooccurrence of Free-Living Amoebae and Nontuberculous Mycobacteria in Hospital Water Networks, and Preferential Growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. Appl Environ Microbiol.2013;79(10):3185–3192.
184. Özçelik S, Coşkun KA, Yünlü O, Alim A, Malatyali E. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. Turkiye Parazitol Derg. 2012;36(4):198-203.
185. Ozkoc S, Tuncay S, Delibas SB, Akisu C, Ozbek Z, Durak I, Walochnik J. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. J Med Microbiol.2008;57(Pt 3):392-6.
186. Page, F.C. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside.1988.
187. Patel A, Hammersmith K Contact lens-related microbial keratitis: recent outbreaks. Curr Opin Ophthalmol.2008;19(4):302-6.
188. Pélandakis M, Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. Appl Environ Microbiol. 2002;68(4):2061-5.



189. Pérez-Irezábal J, Martínez I, Isasa P, Barrón J Keratitis due to *Acanthamoeba*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2006;24 Suppl 1:46-52.
190. Pernin P, Riány A. [Study on the presence of "free-living" amoebae in the swimming-pools of Lyon (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp*.1978;53(4):333-44.
191. Polat ZA, Vural A. Effect of combined chlorhexidine gluconate and neosporin on experimental keratitis with two pathogenic strains of *Acanthamoeba*. *Parasitol Res*.2012;110(5):1945-50.
192. Por YM, Mehta JS, Chua JL, Koh TH, Khor WB, Fong AC, Lim JW, Heng WJ, Loh RS, Lim L, Tan DT. *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *Am J Ophthalmol*.2009;148(1):7-12.e2.
193. Potter JL, Weisman RA. Cellulose synthesis by extracts of *Acanthamoeba castellanii* during encystment. Stimulation of the incorporation of radioactivity from UDP-(14C)glucose into alkali-soluble and insoluble beta-glucans by glucose 6-phosphate and related compounds. *Biochim Biophys Acta*.1976 25;428(1):240-52.
194. Potter JL, Weisman RA. Correlation of cellulose synthesis in vivo and in vitro during the encystment of *Acanthamoeba*. *Dev Biol*.1972;28(3):472-7.
195. Proca-Ciobanu, M., Lupascu, G.H., Petrovici, A.L., and Ionescu, M.D. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol*.1975;5:49–56.
196. Programa de vigilancia sanitaria para la prevención y control de la legionelosis en Aragón. Departamento de Sanidad Bienestar Social y Familiar. Gobierno de Aragón. Disponible en: <http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia>. [actualizado diciembre 2013][consultado en febrero de 2014]

197. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*.1977;13:557–98.
198. Quereda Castañeda A, Vico Ruiz E, Iradier Urrutia MT. Fotoqueratectomía terapéutica: una buena opción de tratamiento en la patología corneal superficial. *Revista Microcirugía ocular Secoir*. 2004;4
199. Quesada, A, D. Sanchis & D. Carrasco. Cianobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic?. *Limnetica*.2004;23 (1-2): 109-118.
200. Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis*. 2009; 199:1139–42
201. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol*. 2013;60(6):626-33.
202. Radford C, Lehman O, Dart JKG. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992–6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82:1387–1392.
203. Radford CF, Minassian DC, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(5):536-42.
204. REAL DECRETO 865/2003, del 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico sanitarios para el control y prevención de la legionelosis. BOE 171 del 18 de julio.
205. REAL DECRETO 742/2013, del 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios de las piscinas. BOE 244 de 11 de octubre. (Actualizado marzo 2014)

206. Renaud Bigot, Joanne Bertaux, Jacques Frere, Jean-Marc Berjeaud Intra-Amoeba Multiplication Induces Chemotaxis and Biofilm Colonization and Formation for *Legionella*. PLoS One. 2013; 8(10): e77875.
207. Rendtorff RC, Holt CJ. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. IV. Attempts to transmit *Endamoeba coli* and *Giardia lamblia* cysts by water. Am J Hyg. 1954;60(3):327-38.
208. Reyes-Batlle M, Todd CD, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Cabello-Vilchez AM, González AC, Córdoba-Lanús E, Lindo JF, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Parasitol Res. 2014;113(4):1383-8.
209. Rivera F, Lares F, Ramirez E, Bonilla P, Rodriguez S, Labastida A, Ortiz R, Hernandez D: Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico City. Rev Infect Dis. 1991;13:388-389.
210. Rivera F, Ramírez E, Bonilla P, Calderón A, Gallegos E, Rodríguez S, Ortiz R, Zaldívar B, Ramírez P, Durán A. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. Environ Res. 1993;62(1):43-52.
211. Rivera F, Ramírez P, Vilaclara G, Robles E, Medina F. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City Environ Res. 1983;32(1):205-11.
212. Rivera F, Roy-Ocotla G, Rosas I, Ramirez E, Bonilla Lares F. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. Environ Res. 1987;42:149– 54.
213. Roch N, Maurin M Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. J Antimicrob Chemother. 2005;55(6):866-71.

214. Rodríguez R, Méndez O, Molina O, Luzardo G, Martínez AJ, Visvesvara GS, Cardozo J. [Central nervous system infection by free-living amoebas: report of 3 Venezuelan cases]. *Rev Neurol*.1998;26(154):1005-8.
215. Rønn R, McCaig AE, Griffiths BS, Prosser JI. Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*.2002;68(12)
216. Rose CS, Martyny JW, Newman LS, Milton DK, King TE Jr, Beebe JL, McCammon JB, Hoffman RE, Kreiss K. "Lifeguard lung": endemic granulomatous pneumonitis in an indoor swimming pool.*Am J Public Health*.1998;88(12):1795-800
217. Roset J., Aguayo S., Muñoz MJ.Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión.*Rev. Toxicol*.2001;18:65-71
218. Rowbotham T J. *Legionella*-like amoebal pathogens. In: Barbaree J M, Breiman R F, Dufour A P, editors. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington, D.C: American Society for Microbiology.1993; pp. 137–140.
219. Salah IB, Ghigo E, Drancourt M. Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*.2009;15(10):894-905
220. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V, Gatti S, Bernuzzi AM, de Jonckheere JF. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, *Vahlkampfiidae*) from a spa in northern Italy. *Appl Environ Microbiol*.1983;46(6):1282-5.
221. Schmitz-Esser S, Tischler P, Arnold R, Montanaro J, Wagner M, Rattei T, Horn M.The genome of the amoeba symbiont "*Candidatus Amoebophilus asiaticus*" reveals common mechanisms for host cell interaction among amoeba-associated bacteria.*J Bacteriol*.2010;192(4):1045-57.

222. Schroeder, J. M., G. C. Booton, J. Hay, I. A. Niszl, D. V. Seal, M. B. Markus, P. A. Fuerst, and T. J. Byers. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*.2001;39: 1903–1911.
223. Schuster FL, De Jonckheere JF, Moura H, Sriram R, Garner MM, Visvesvara GS. Isolation of a thermotolerant *Paravahlkampfia* sp. from lizard intestine: biology and molecular identification. *J Eukaryot Microbiol*.2003; 50(5):373-8.
224. Schuster FL, Dunnebacke TH, Booton GC, Yagi S, Kohlmeier CK, Glaser C, Vugia D, Bakardjiev A, Azimi P, Maddux-Gonzalez M, Martinez AJ, Visvesvara GS. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J Clin Microbiol*.2003;41(7):3175-80.
225. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*.2004;34(9):1001-27.
226. Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat*.2004;7(1):41-51. Review.
227. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*.2002;15(3):342-54.
228. Seal D, Beattie TK, Tomlinson A, Fan D, Wong E. *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*.2003;87:516–517.
229. Sharifi N, Botero-Kleiven S, Ohman D, Barragan A, Winiacka-Krusnell J. Genotypic characterization of *Acanthamoeba* spp. causing ocular infections in Swedish patients: identification of the T15 genotype in a case of protracted keratitis. *Scand J Infect Dis*.2010;42(10):781-6.

230. Sharma R, Jhanji V, Satpathy G, Sharma N, Khokhar S, Agarwal T. Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. *Optom Vis Sci*. 2013 Feb;90(2):e53-55.
231. Shoff M, Rogerson A, Schatz S, Seal D. Variable responses of *Acanthamoeba* strains to three multipurpose lens cleaning solutions. *Optom Vis Sci*. 2007;84(3):202-7.
232. Shoff ME, Rogerson K, Kessler K, Schatz S, Seal DV. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in south Florida domestic water. *J Water Health*. 2008;6:99–104.
233. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012;10:5-6.
234. Simmons PA, Tomlinson A, Seal DV. The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. *Optom Vis Sci*. 1998;75(12):860-6.
235. Skriwan C, Fajardo M, Hägele S, Horn M, Wagner M, Michel R, Krohne G, Schleicher M, Hacker J, Steinert M. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol*. 2002;291(8):615-24.
236. Smirnov A V, Chao E, Nasonova E S, Cavalier-Smith T. A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa) .*Protist*. 2011;162(4):545-570
237. Smirnov A, Nasonova E, Berney C, Fahrni J, Bolivar I, Pawlowski J. Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist*. 2005;156(2):129-42.
238. Smirnov, A. and Goodkov, A. An illustrated list of basis morphotypes of *Gymnamoebia* (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology*. 1999;1:20-29.

239. Smirnov, A.V., Chao, E.E., Nassonova, E., Cavalier-Smith, T. Revised classification of non-mycetozoa naked lobose amoebae (Amoebozoa). *Protist*. 2011;162:545–570.
240. Sood A, Sreedhar R, Kulkarni P, Nawoor AR. Hypersensitivity pneumonitis-like granulomatous lung disease with nontuberculous mycobacteria from exposure to hot water aerosols. *Environ Health Perspect*. 2007;115(2):262-6
241. Spanakos G, Tzanetou K, Miltsakakis D, Patsoula E, Malamou-Lada E, Vakalis NC. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece--report of a clinical isolate presenting T5 genotype. *Parasitol Int*. 2006;55(2):147-9
242. Steinert M, Birkness K, White E, Fields B, Quinn F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(6):2256-61
243. Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389-3402.
244. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol*. 1998;45(1):45-54.
245. Stothard, D.R., Hay, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Seal, D.V., and Byers, T.J. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2687–2693.

246. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.*2003;9(11):1444-52.
247. Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of free-living amoebae causing human diseases. *J Med Microbiol.*1998;47:5–16.
248. Tanveer T, Hameed A, Muazzam AG, Jung SY, Gul A, Matin A. Isolation and molecular characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotypes from diverse water resources including household drinking water from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan.*Parasitol Res.*2013;112(8):2925-32
249. Taylor RH, Falkinham JO III, Norton CD, LeChevallier MW Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol.*2000;66:1702
250. Thegerström J, Romanus V, Friman V, Brudin L, Haemig PD, Olsen B. *Mycobacterium avium* lymphadenopathy among children, Sweden. *Emerg Infect Dis.*2008;14(4):661-3.
251. Thomas JM, Ashbolt NJ. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ Sci Technol.*2011 1;45(3):860-9.
252. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Lévi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence.*J Appl Microbiol.*2004;97(5):950-63
253. Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network.*Appl Environ Microbiol.*2006;72(4):2428-38.



254. Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol.* 2008;10(10):2728-45.
255. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;34:231–259.
256. Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today.* 2000;16(5):210-3.
257. Tosini F, Drumo R, Elwin K, Chalmers RM, Pozio E, Cacciò SM. The CpA135 gene as a marker to identify *Cryptosporidium* species infecting humans. *Parasitol Int.* 2010;59(4):606-9.
258. Trabelsi H1, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris).* 2012;60(6):399-405.
259. Trabelsi H, Sellami A, Dendana F, Sellami H, Cheikh-rouhou F, Makni F, et al. Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite.* 2010;17:67–70.
260. Tripathi T, Smith AD, Abdi M, Alizadeh H. *Acanthamoeba*-cytopathic protein induces apoptosis and proinflammatory cytokines in human corneal epithelial cells by cPLA2 $\alpha$  activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(13):7973-82.
261. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res.* 2004;92(5):405-13

262. Urrutia-Cordero P, Agha R, Cirés S, Lezcano MÁ, Sánchez-Contreras M, Waara KO, Utkilen H, Quesada A. Effects of harmful cyanobacteria on the freshwater pathogenic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Aquat Toxicol.*2013;130-131:9-17.
263. Üstüntürk M, Zeybek Z. Microbial contamination of contact lens storage cases and domestic tap water of contact lens wearers. *Wien Klin Wochenschr.* 2012;124 Suppl 3:17-22.
264. Valster RMr, B.A. Wullings, G. Bakker, H. Smidt, D. van der Kooij. Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenic analysis of 18S rRNA gene sequences *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(14):pp.4736–4746.
265. Valster RMr, B.A. Wullings, D. van der Kooij. Detection of protozoan hosts for *Legionella pneumophila* in engineered water systems by using a biofilm batch test. *Appl. Environ. Microbiol.*2010;76(21):pp. 7144–7153.
266. Vanessa B, Virginie M, Nathalie Q, Marie-Hélène R, Christine I. *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida* spp. in tap-water. *Water Res.*2012;46(17):5707-14.
267. Vesaluoma M, Kalso S, Jokipii L, Warhurst D, Pönkä A, Tervo T. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? *Br J Ophthalmol.*1995;79(2):178-81.
268. Vincent Delafont, Amélie Brouke, Didier Bouchon, Laurent Moulin, Yann Héchard. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Research.*2013; 47(19): 6958-6965.
269. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.*2007;50:1–26.

270. Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N.Sp., Agent of Amebic Meningoencephalitis in Human and Other Animals. *J Euk. Microbiol.*1993;40(4):504-514.
271. Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, Bandyopadhyay K, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Cabral GA. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J Eukaryot Microbiol.*2009;56(4):357-66.
272. Vodkin, M.H., Howe, D.K., Visvesvara, G.S., and McLaughlin, G.L. Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J Protozool.*1992;39:378–385.
273. Voyatzis G, McElvanney A. Bilateral *Acanthamoeba* keratitis in an experienced two-weekly disposable contact lens wearer. *Eye Contact Lens.*2007;33(4):201-2.
274. Walochnik J1, Haller-Schober E, Kölli H, Picher O, Obwaller A, Aspöck H Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens- wearing keratitis patients in Austria. *J Clin Microbiol.*2000;38(11):3932-6.
275. Weekers PH, Gast RJ, Fuerst PA, Byers TJ. Sequence variations in small-subunit ribosomal RNAs of *Hartmannella vermiformis* and their phylogenetic implications. *Mol Biol Evol.*1994;11(4):684-90
276. Weekers, P. H. H., P. L. E. Bodelier, J. P. H. Wijen, and G. D. Vogels. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*1993;59:2317-2319.
277. Westrick JA, Szlag DC, Southwell BJ, Sinclair J. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Anal Bioanal Chem.*2010;397(5):1705-14.

278. Whan L, Grant IR, Rowe MT. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* 2006;13;6:63.
279. Whiley H, Keegan A, Giglio S, Bentham R. *Mycobacterium avium* complex--the role of potable water in disease transmission. *J Appl Microbiol.* 2012;113(2):223-3.
280. Winck MA, Caumo K, Rott MB. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol.* 2011;63(5):464-9.
281. Wörmer L, Cirés S, Agha R, Verdugo M, de Hoyos C, Quesada A. First detection of cyanobacterial PSP (paralytic shellfish poisoning) toxins in Spanish freshwaters. *Toxicon.* 2011;57(6):918-21.
282. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(4):1578-83.
283. Yousuf FA, Siddiqui R, Subhani F, Khan NA. Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. *J Water Health.* 2013;11(2):371-5.

## **VIII. ANEXOS**

## Minireview

## Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae

Pilar Goñi,<sup>1\*</sup> María Teresa Fernández<sup>1</sup> and Encarnación Rubio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Area of Parasitology and <sup>2</sup>Area of Preventive Medicine and Public Health (Biostatistic), Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

## Summary

**The association between free-living amoebae and pathogenic bacteria is an issue that has gained great importance due to the environmental and health consequences that it implies. In this paper, we analyse the techniques to follow an epidemiological study to identify associations between genera, species, genotypes and subgenotypes of amoebae with pathogenic bacteria, analysing their evolution and considering their usefulness. In this sense, we highlight the combination of microscopic and molecular techniques as the most appropriate way to obtain fully reliable results as well as the need to achieve the standardization of these techniques to allow the comparison of both environmental and clinical results.**

## Introduction

Since Dujardin described the first amoeba in 1841, a great number of studies have been carried out on these protozoa, differentiating a large number of species. Thus in 1899, Schardinger described *Naegleria gruberi*, although it took a long time before their pathogenic role was proved, after Culbertson and colleagues (1959) inoculated animals with amoebae, infecting them with fatal meningo encephalitis.

The free-living amoebae (FLA) are part of environmental microbial communities of water, soil and generally wet environments, thus humans and animals are in

permanent contact with them. Moreover, in their role as predators of bacteria, they contribute to the stability of microbial communities, maintaining population sizes which promote the diversity of species of microorganisms and sustaining the flow of energy and matter through food webs (Anderson, 2010). However, it was the demonstration of their possible pathogenicity, together with the important role they play in the development and spread of diseases such as Pontiac fever, which encouraged detailed studies of these microorganisms (Rowbotham, 1981; Skinner *et al.*, 1983). The first issue of interest was to understand the mechanisms used by the amoeba to ingest bacteria, but soon the problem became complicated when it was noted that some amoebae were infected with bacteria (Jeon and Lorch, 1967). This aspect had already been reported by Drozanski in 1956 when he observed that some bacteria were able to infect *Acanthamoeba* strains resulting in the death of the amoeba, while other amoebae were resistant to infection by the same bacteria (Drozanski and Chmielewski, 1979). These findings suggest that some of the apparently non-pathogenic amoebae-inhabiting water could act as vectors of potentially pathogenic bacteria and viruses; therefore it was advisable to perform stricter biological controls of drinking and pool water (Jadin, 1974). Subsequently in 1975, De Jonckheere and colleagues (1975) isolated *Naegleria* from a thermally polluted canal, with the same antigenic structure of the strains that affect humans, causing the alarm about the sanitary risk posed by resistance of some bacteria, such as leprosy-causing mycobacteria to the lytic action of amoebae. Since then, many studies have applied new techniques which include the molecular techniques of recent years. Thus, at present, it is recognized that *Acanthamoeba*, the most frequent FLA in the environment which produces infections in humans, serves as host for a large number of pathogenic bacteria including *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* O157, *Legionella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio cholerae*, and almost 20% of clinical and environmental *Acanthamoeba* harbour intracellular bacteria (Thom *et al.*, 1992; Fritsche *et al.*,

Received 31 July, 2013; revised 17 December, 2013; accepted 17 December, 2013. \*For correspondence. E-mail pgoni@unizar.es; Tel. +34 976 76 24 21; Fax +34 976 76 26 04.

2000; Landers *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2006; Gourabathini *et al.*, 2008; Salah *et al.*, 2009; Yousuf *et al.*, 2013). In addition, it is known that some viruses such as echovirus, mimivirus, Coxsackie virus and adenovirus can infect *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007; Suzan-Monti *et al.*, 2007). Also, FLAs appear able to act as carriers or vectors of cryptosporidia (Gómez-Couso *et al.*, 2007; Scheid and Schwarzenberger, 2011). Many questions remain to be answered about the association between protozoa and other pathogens. It is a complex problem with a great impact on health, because amoebae inhabit certain ecosystems where they maintain close contact with pathogenic agents such as wastewater discharges or water used for irrigation of vegetables intended to be consumed raw (Gourabathini *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2011).

One of the most important issues when dealing with the identification of endosymbionts and their association with free-living amoebae is the selection of the techniques to be used. The aim of this paper was to review the culture- and polymerase chain reaction (PCR)-based techniques available to perform an epidemiological study on the association of bacteria and free-living amoebae.

### **Amoeba-bacteria cultures (microbiological methods)**

The possibility of cultivating amoebae is a great advantage for their in-depth study since it allows a variety of experiments in both environmental and clinical issues to be performed. The first step is to observe their behaviour in different conditions (temperature, osmolarity, pH, bacterial genera and species), and to obtain the sufficient quantity of cells needed for a variety of experiments involving their observation, the performance of co-cultures or sensitivity studies.

The first description of soil protozoa cultures in nutrient media corresponds to Singh (1946). From this, other authors provide modifications involving the addition of dead bacteria as food for protozoa or variations in bacteria genera in order to determine the optimal conditions for their in vitro growth (Chang, 1960; Drozanski and Drozanska, 1961; Culbertson *et al.*, 1965).

The culture media consisted mainly of solid media, such as 0.5 Yeast Peptone agar (YP). The bacteria to be tested were inoculated as streaks or circles. Amoebae were then inoculated over previously grown bacteria. In this way, it was possible to observe the amoeba's ability to phagocytize the bacteria, or whether the bacteria produce a toxic compound (Groscop and Brent, 1964; Upadhyay, 1968).

In this medium, nutrients enhance bacterial overgrowth and inhibit amoeba proliferation, which can interfere with the observations. For this reason, modifications began to

emerge, including the addition of heat-killed bacteria (treatment at 65°C for 30 min) or antibiotics to prevent bacterial proliferation in the culture medium (Culbertson *et al.*, 1965). Adding dead bacteria as food has the additional advantage that these do not interfere with the bacteria to be tested in the co-cultures. But in the case of cultures on solid medium, the bacteria were added to the agar, hindering the access of the amoebae moving on the agar surface and therefore observation. Thus, the next development was to place the bacteria on the surface of the agar.

Other media used were Broth-Heart-Infusion agar (BHI) (Upadhyay, 1968), Stoianovitch's malt extract, yeast extract agar, prepared with Page's amoebal saline, pH 6–9 and sophisticated modifications of these (Rowbotham, 1983). Nowadays, the use of non-nutrient agar plates is recommended covered with a Gram-negative bacteria, not encapsulated or pigmented (live or heat inactivated), for isolation of FLA from both environmental and clinical samples. Plates are incubated at 30°C for up to 48 h. In these solid media grow free-living amoebae such as *Acanthamoeba*, *Hartmannella* and *Naegleria* and, in general, undemanding genera. However, some genera may require special media, temperatures or special culture conditions, such as *Balamuthia* which does not grow with bacteria as food source but has been grown in tissue-cell cultures (Schuster, 2002).

Axenic cultures can also be prepared, with the advantage that the absence of bacteria avoids interferences. Several formulations have been used over time: 2% Bacto Casitone (Proca-Ciobanu *et al.*, 1975), Proteose peptone-Yeast extract-Glucose (PYG) medium, (Drozanski and Chmielewski, 1979), Casitone-based media with or without NaCl and with 5% foetal calf serum, penicillin and streptomycin (Tyndall and Domingue, 1982). Composition of the media varies as a function of the targeted genera, from these simple media in which *Acanthamoeba* or *Naegleria* can grow to the heavily supplemented basic medium required by *Balamuthia*. Amoebae can also be grown axenically in tissue-cell cultures where amoeba acts as predator of the cells (Schuster, 2002). In addition, different strains within the genus *Acanthamoeba* appear to have different nutritional requirements since not all are able to grow in axenic media.

The most commonly amoeba used in experiments requiring co-cultivation is *Acanthamoeba*. There is a wide range of methods for performing the co-cultures of bacteria and amoeba, but all cases involve the contact of both microorganisms, in saline solution or water and subsequent growth in the same medium used in amoeba culture (Collingro *et al.*, 2005). Examples of this type of study are those conducted to demonstrate the ability of free-living amoebae to protect *Legionella* from the action of biocides and disinfectants (Barker *et al.*, 1992).

## Microscopic observation

When bacteria and amoeba establish contact, bacteria can be internalized in the amoeba or remain adhered to its surface. Determining the location of the bacterium is a limiting step when interpreting the results obtained.

The first reliable technique that appears in the literature is electron microscopy, used in the visualization of symbiotic microorganisms in some amoebae such as *Pelomyxa palustris* (Jeon and Lorch, 1967). Also in 1967, two different bacteria inside *A. discoides* were identified by electron microscopy. The limitations of the technique only allowed the certain confirmation that they were Gram-negative bacteria and had different electron density. It was also observed that the bacteria were located within vesicles or vacuoles although it was unknown whether they were viable because growth was not achieved. Some of these bacteria were in the division phase, which finally resulted in the death of the protozoa or in producing permanently infected clones.

Isolation of these vacuoles is achieved with a simple treatment of the amoeba collected by centrifugation of a liquid culture or plate with 2N NaOH.

Other studies were aimed at understanding the lytic activity of some bacteria (Upadhyay, 1968), finding that there is indeed a preference of the amoebae for some bacteria. The genera *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* promote growth of the amoebae, while others, usually Gram-positive, such as *Bacillus*, and some yeasts and fungi prevent growth. These hypotheses are supported when bacteria are viewed inside amoebae by electron microscopy or by phase contrast microscopy. However, this did not take into account that the bacteria already present in the amoeba before the experiment interfere in the observations which could be misleading (Upadhyay, 1968; Depraitère and Darmon, 1978).

In 1975, electron microscopy allowed Proca-Ciobanu and colleagues to see differences between free bacteria in the cytoplasm of a strain of *Acanthamoeba castellanii*, which exhibited cell division aspects, and those used as amoeba feed, which appear inside vacuoles. The number of free bacteria varies for different amoeba cells and they are uniformly distributed without apparent form clustered around organelles (Proca-Ciobanu *et al.*, 1975). Years later, Jeon and Jeon (1976) point out that the association between amoebae and bacteria can evolve to result in an obliged symbiosis in a short period of time. About 2 years later, Jeon and Ahn (1978) performed amoebae lysis with 2N NaOH, with 20 previous washes to ensure that the cells do not carry adhered bacteria and concluded that amoebae eventually develop dependence on the acquired endosymbiont. When the growth temperature is high, the amoeba can destroy the bacteria located in the vacuole, but usually they are

integrated within the cell as a required component (Jeon and Ahn, 1978). Subsequent attempts to eliminate endosymbionts with chloramphenicol resulted in a decreased number but without achieving complete elimination (Jeon and Hah, 1977).

An example of a standard protocol for electron microscopy involves washing trophozoites with PBS buffer, they are prefixed with glutaraldehyde in cacodylate buffer, the sediment post-fixed with osmium tetroxide, rinsed with maleate buffer, dehydrated with ethyl alcohol and treated with propylene oxide. The pellets must be immersed overnight in propylene oxideresin (1:1) with shaking, and then embedded in resin and incubated overnight at 60°C. Ultrathin sections cut with ultramicrotome are then stained with uranyl acetate and citrate, and observed under an electron microscope (Xuan *et al.*, 2007).

In addition, there are staining techniques that, by means of light microscopy, have been used to differentiate bacteria inside amoebae from those attached to its surface. Among these, Giemsa and Gimenez stain stands out for its usefulness (Hall and Voelz, 1985; Vandenesch *et al.*, 1990; Nahapetian *et al.*, 1991; Fritsche *et al.*, 2000).

In co-culture experiments performed with known bacteria, specific stains can be applied, as in the case of *Legionella* that can be detected by immunofluorescence (Anand *et al.*, 1983; Henke and Seidel, 1986; Kilvington and Price, 1990). Also, intra-amoebal multiplication of mycobacteria could be measured by microscopic counting of intra-amoebal bacteria after Zielh or fluorescent acid-fast staining (Salah *et al.*, 2009).

## Cell sorting

Some newer techniques can be used as complement to determine the existence and the location of bacteria inside amoebae. For example, using co-cultures with the green fluorescent protein (GFP) with subsequent flow cytometry to separate populations of amoeba from bacteria. Then, fluorescence emission allows to monitor the location of bacteria within amoeba or vacuoles by epifluorescence microscopy (Douesnard-Malo and Daigle, 2011; Finsel *et al.*, 2013). Cell sorting also allows obtaining single cells to quantify bacterial accumulation into a single amoeba or subsequent genetic studies (Buse and Ashbolt, 2012; McLean *et al.*, 2013).

On the other hand, flow cytometry techniques have been applied to the study of structure and composition of natural communities (Vives-Rego *et al.*, 2000; Kron *et al.*, 2007). Plate-culturing techniques only reveal a small proportion (viable and cultivable organisms) of the total microbial population. Culture conditions could select some populations of bacteria and amoebae, and also less-abundant populations could be neglected on agar



plates or could be underrepresented in further PCR amplifications. This could be translated in the loss of major populations due to culture selectivity or less abundant populations, which although considered to be of minor importance, play an important role for a given ecosystem (Wallner *et al.*, 1997). In 1982, Muldrow and colleagues (1982) developed efficient and reliable flow cytometric methods for the identification of pathogenic and nonpathogenic amoebae in natural habitats. These techniques combined flow cytometry with immunofluorescent staining with specific antisera to detect *Naegleria fowleri*, *Naegleria lovaniensis*, *Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba royreba*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba rhyssodes* and *Acanthamoeba* spp isolates 5334 and A3, and requires previous culture of environmental samples. They concluded that in contrast to fluorescent microscopy, the statistical sound methodology provided by flow cytometry for rapid species identification of pathogenic free-living amoebae from environmental samples permits large-scale screening which can be undertaken with ease and accuracy. Aquatic systems are the most studied with application of flow cytometry to natural populations (Gruden *et al.*, 2004), but also other protocols to study soils or other complex matrix are developed (Prorot *et al.*, 2012). It is also possible to detect numerous and even rare cells against a background of other microorganisms by combining flow cytometry and specific fluorescent probes, species-specific fluorescent labelling or molecular techniques. In conjunction with fluorescent dyes, flow cytometry is able to measure various biological and structural parameters, allowing the detection of microorganisms in viable, viable but non-cultivable and non-viable states. Also the difficulty of microscopic techniques for detection, identification and enumeration of resting stages of microorganisms present in the environmental samples but also in axenic cultures could be avoided using flow cytometry combined with differential surface staining, antibody labelling and autofluorescence measurement (Ferrari *et al.*, 2000; Dreyer *et al.*, 2006; Ochiai *et al.*, 2006).

### Molecular techniques

The techniques discussed above allow the observation of endosymbiont bacteria inside amoebae and even to define their exact location and whether they are able to multiply, but these methods only allow us to determine whether they are Gram-positive or Gram-negative bacteria. However, genera and species identification is necessary to establish the existence of a health risk since not all bacteria can be internalized into the amoebae or resist its lytic action, and therefore they could be non-pathogenic bacteria.

Molecular biology techniques such as PCR have the sensitivity and specificity needed to identify accurately the genera and species of free-living amoebae inhabiting our aquatic ecosystems, and also open an extraordinary door to identify bacterial endosymbionts. These techniques are very important for conducting epidemiological studies to associate genera, species, genotypes and subgenotypes of amoebae and amoeba-resistant bacteria.

Current culture-based techniques for identification of amoebae down to species level are time consuming and laborious, as they required the cultivation, followed by morphological identification using microscopic observation by following the steps established by Page (1988). It should be considered that different culture conditions lead to variations in the morphology of the amoebae, and observations will depend largely on the experience and skills of the observer. Molecular techniques based fundamentally on PCR also have some disadvantages, such as difficulty in amplifying some FLA strains due to the genetic variability of the amoebae, the lack of specific primers for some genera and species and sometimes mismatches with morphological observations. That is why De Jonckheere and colleagues (2012) suggest that both PCR and morphological observation must be performed in a complementary way.

The first techniques applied were Restriction Fragment LENGTH polymorphism (RFLP) of mitochondrial and total DNA to type strains and species of both *Acanthamoeba* and *Naegleria* (De Jonckheere, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988; Kilvington *et al.*, 1991). Taking as an example the case of *Acanthamoeba*, Johnson and colleagues (1990) determined the partial sequence of small subunit ribosomal ribonucleic acid (rRNA) of some isolates and reported a high degree of variability in the sequences of the 18S rRNA (Johnson *et al.*, 1990). In 1992, Vodkin and colleagues designed a PCR that not only attempts to differentiate species but also pathogenicity (Vodkin *et al.*, 1992). Later, Gast and colleagues determined the complete genetic sequence of the small subunit of the nuclear rRNA (Rns) and proposed a classification scheme based on this sequence (Gast *et al.*, 1996). Using this parameter, Stothard and colleagues (1998) classified *Acanthamoeba* genera in 53 species, defining 12 genotypes based on phylogenetic reconstructions of the 18S rDNA, which included 1846 alignable base obtained from the complete sequences (2300–2700 bp) (Stothard *et al.*, 1998; 1999). At present, 17 different genotypes (T1–T18) of *Acanthamoeba* have been established (Stothard *et al.*, 1998; Horn and Schwenzer, 1999; Gast, 2001; Hewett *et al.*, 2003; Corsaro and Venditti, 2010; Nuprasert *et al.*, 2010; Qvarnstrom *et al.*, 2013).

Most clinical and environmental isolates belong to the T4 genotype, which also presents the greater genetic variability, it being necessary a subdivision of this genotype for

epidemiological studies. In the case of *Acanthamoeba*, the use of the primers JDP1 and JDP2, which amplify an 18S rRNA variable region called 29-1 or diagnostic fragment 3 (DF3), are widespread (Booton *et al.*, 2002). Another PCR that works very well and is specific for *Acanthamoeba* is designed by Nuprasert and colleagues (2010) when identifying genotype T17. Moreover, species differentiation can be performed by PCR with subsequent RFLP using various restriction enzymes *AluI*, *CfoI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HinfI*, *HaeIII*, *HindIII* and *TaqI* and studying the profiles obtained (Khan and Paget, 2002). A combination of these two PCR produces the best results, since the last enlarges and ensures the results of the first as well as permits identification of those *Acanthamoeba* not amplified with the primers JDP1–JDP2.

Also, PCR reactions were designed for *Naegleria* identification, using specific primers for genus or species, and other less specific ones designed to identify a variety of genera of FLA and for identifying *Balamuthia* (Ahmad *et al.*, 2011). In Table 1, the PCR we consider most useful are referenced. Subsequently, the development of techniques for real-time PCR has permitted the develop-

ment of reactions not only to identify amoebae, usually Amebozoan and Vahlkampfiidae, but also for their quantification (Kuiper *et al.*, 2006; Madarová *et al.*, 2010; Le Calvez *et al.*, 2012). The major disadvantage to real-time PCR is that it requires expensive equipment and reagents. In addition, due to its extremely high sensitivity, sound and precise experimental design, and an in-depth understanding of normalization techniques are imperative for accurate conclusions.

Different staining techniques can be used to detect bacteria using microscopy techniques, but for their identification other techniques are required. The simplest is the recovery of the bacteria grown in different selective culture media starting from amoebae grown in axenic media after multiple washings. This confirmed the presence of viable bacteria inside of the amoeba. However, it is not always possible since the uncultivable bacteria or these in low number cannot be recovered, and in this case, molecular techniques may be used. The most common technique includes amplification of a fragment of the 16S rRNA gene by PCR or real-time PCR in which case quantification of the endosymbionts may be

**Table 1.** Some examples of useful PCR to identify amoebae and endosymbiont bacteria.

Gene	Primer name	Specificity	Ref
Repetitive 18S rDNA 18S-5.8S ITS	APO1.for1 APO1.rev 440 ACARNA.for 1383 ACARNA.rev 1655 ACARNA.for 1345 ACARNA.rev 1830 ACA18.for 2209 ACA58.rev 92	<i>Acanthamoeba</i> Strain Genus Pathogen Species	Vodkin <i>et al.</i> , 1992
ASA.S1 (DF3)	JDP1 JDP2	<i>Acanthamoeba</i> spp	Schroeder <i>et al.</i> , 2001
18S rADN	ACAN18SF0 ACAN18SR0	<i>Acanthamoeba</i> spp	Nuprasert <i>et al.</i> , 2010
18S rADN	P-FLAF P-FLAR	Free-living amoeba	Tsvetkova <i>et al.</i> , 2004
<i>mp2c15</i>	Mp2C15.for Mp2C15.rev Mp2C15.for-in Mp2C15.rev-in	<i>N. fowleri</i>	Marciano-Cabral <i>et al.</i> , 2010
ITS	ITS1 ITS2	<i>Naegleria</i> spp <i>Hartmannella</i> spp <i>Vahlkampfia</i> spp <i>Willaertia</i> spp	Pélandakis & Pernin, 2002
18S rDNA	For Rev	<i>Acanthamoeba</i> genus specific	Khan & Paget, 2002
16S rDNA	16S RNA-F 16S RNA-R	<i>Campylobacter jejuni</i>	Bui <i>et al.</i> , 2012
<i>mip mcyD hsp65 16S rDNA ompU</i>	Mip-Leg186-F Mip-Leg186-R McyD-fow McyD-rev Hsp65-dir Hsp65-rev R16S-dir R16S-rev OmpU-dir OmpU-rev	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Toxigenic cyanobacteria</i> <i>Mycobacterium</i> spp <i>Pseudomonas</i> spp <i>Vibrio cholerae</i>	Calvo <i>et al.</i> , 2013

performed (Salah *et al.*, 2009). If previous cell sorting had been performed to obtain individual cells, genetic studies to identify the bacteria included in amoebae could be made by amplification of 16S rRNA fragments, using bacterial universal primers (Lane, 1991; Horn and Wagner, 2004; Corsaro and Venditti, 2009; Corsaro *et al.*, 2009). These primers allow identification of bacteria when they are not known, but specific primers should be used when to determine the presence of specific bacteria is the objective. These techniques require further sequencing of the PCR product. However, if a mixed population of bacteria is located inside amoeba, the sequence will not be resolved. Other genes have been used as a target to identify bacteria. The most common bacteria found associated with protozoa (amoebae and ciliates) are *Legionella*, *Mycobacterium* and *Chlamydia* and *Pseudomonas*. While *Mycobacterium* can proliferate either free in the environment or within eukaryotic cells, *Legionella pneumophila* in the natural environment may require eukaryotic cytoplasmic environments for replication (Marciano-Cabral *et al.*, 2010). Identification of *Legionella* can be performed by amplification of the macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene, and *Mycobacterium* by specific amplification of 16S rRNA (Pabst *et al.*, 1997; Marciano-Cabral *et al.*, 2010). Other bacteria that have also been found as potential hosts of free-living amoebae are *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* and *Chlamydia* spp (Abd *et al.*, 2005; 2007; Coulon *et al.*, 2012).

Aquatic environments are reservoirs for *Campylobacter jejuni* and contaminated drinking water has been implicated in several *C. jejuni* outbreaks (Thomas *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2003). On the other hand, amoebae can promote the survival of *C. jejuni*, but this growth is extracellular and the majority of internalized *C. jejuni* do not survive ingestion by *Acanthamoeba castellanii* beyond 5 h. Therefore, a very small number of bacterial cells are able to survive intracellularly and are thereby protected from external disinfectant killing during this time frame (Bui *et al.*, 2012).

Asides from these PCR based, there is a nested PCR which has permitted the simultaneous detection of a group of potentially pathogenic bacteria, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp and *Pseudomonas* spp, and adds the detection of toxic cyanobacteria of the genus *Microcystis* due to environmental and health implications of toxic blooms. Thus, the presence of these potentially pathogenic bacteria has been demonstrated in natural, recreational and drinking water supplies (Calvo *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2013).

Another aspect that molecular techniques allow us to address is the possible gene exchange between endosymbiont bacteria and amoebae, but in order to properly interpret the results, a greater number of

sequenced genomes of amoeba will be required than those available at present (Horn and Schwenzer, 1999; Gimenez *et al.*, 2011; Bertelli and Greub, 2012).

The application of much more sensitive and specific molecular techniques has permitted the classification of amoebae genera, species, genotypes and subgenotypes as well as the identification of some pathogenic or potentially pathogenic intracellular bacteria, so that, in the future, the associations may be better understood. For this, morphological observations also play an important role. These are much more subjective but should not cease to be used as a complement to molecular techniques in order to confirm and standardize the experiments. Table 2 summarizes the available techniques cited in this work.

Both for identifying amoebae in environmental samples and studying associations with bacteria, if equipment is not a limitation, cell sorting by flow cytometry followed by molecular techniques is the preferred method because it allows the populations to be sorted, avoiding the mixed cultures. If this equipment is not available, then identification of the amoebae by PCR with specific primers is the best choice. In the case of *Acanthamoeba*, a combination of PCR described by Booton and colleagues (2002) and Nuprasert and colleagues (2010) facilitates their classification into genotypes and subgenotypes. If morphology does not correspond to *Acanthamoeba* or *Neogleria* or not provide clear information, the PCR described by Tsvetkova and colleagues (2004) is suitable. In order to identify endosymbiont bacteria, at least four subcultures in axenic medium or in non-nutritive agar with heat inactivated *E. coli* are need so as to remove those bacteria that may be adhering to the outside of the amoeba. Repeated washing and subsequent Gimenez staining ensure the presence of bacteria inside the amoeba and its absence on the exterior. The subsequent PCR to apply depend on the objective of the research, but the use of universal primers, 16sRNA type, can lead to mixed amplifications that cannot be resolved by sequencing. The multiplex-nested PCR described by Calvo and colleagues (2013) is simple to perform, requires only basic equipment and allows the detection of various genera of potentially pathogenic bacteria simultaneously with good sensitivity and specificity. The RT-PCR techniques allow us to quantify amoebae and bacteria inside them, but they are complex and require expensive equipment and reagents.

Finally, we should underline the interest of standardizing experiments performed in the epidemiology of bacteria-associated free living amoebae in both environmental and clinical studies in order to perform comparisons and achieve a more global view of the situation. To do this, it is advisable to conduct meta-analyses on the subject.

**Table 2.** Summary of available techniques cited in this work.

Technique	Limitations	Application
Culture	Nutritive agar	+ Living bacteria + Antibiotics w/o HI bacteria
	Non-nutritive agar	+ Living bacteria + HI bacteria Without bacteria + Stain
Microscopic observation	Axenic culture	Immunofluorescence
	Optic microscopy	GFP (Epifluorescence)
Cell sorting	Electronic microscopy	
Molecular techniques	Fluorescence	
	PCR	PCR PCR + RFLP Nested PCR
	Real-time PCR	
	Single-cell sequencing	

HI, heat inactivated.

**Limitations**

- Bacterial growth is possible.
- Amoebae may carry bacteria on its surface.
- Some bacteria are not able to grow.
- Is difficult to precise bacterial location.
- Does not allow to identify the bacteria.
- Requires instrumentation and skills
- It is expensive and requires instrumentation.
- Requires instrumentation and skills
- Requires product sequencing
- Requires instrumentation and skills
- Specific primers are needed depending on the subject to identify or if they are mixed populations.
- Some FLA are difficult to identify.
- Some RFLP can be complex to interpret.
- It is expensive and requires instrumentation.
- Specific primers are needed depending on the subject to identify or if they are mixed populations.
- It is expensive and requires instrumentation.

**Application**

- To obtain amoebae for further analysis: identification, genetic analysis, activity of compounds, determination of viable cysts
- To establish contact between bacteria and amoebae to study its internalization
- To determine endosymbiont location inside of the amoebae
- Separation of the host cells and endosymbionts
- To obtain individual cells for further analysis
- Identification of amoebae and their endosymbionts
- Determination of possible gene exchange between endosymbionts and their hosts
- Identification of amoebae and their endosymbionts
- It allow to quantify
- Determination of possible gene exchange between endosymbionts and their hosts
- Identification of amoebae and their endosymbionts
- + Real time PCR, it allow to quantify
- Determination of possible gene exchange between endosymbionts and their hosts

**Acknowledgements**

The authors are grateful for the kind support provided by FIS 09/1585 and DGA-FSE consolidate group B82.

**Conflict of interest**

None to declare.

**References**

- Abd, H., Weintraub, A., and Sandström, G. (2005) Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ Microbiol* **7**: 1003–1008.
- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G.B., and Sandström, G. (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 33–39.
- Ahmad, A.F., Andrew, P.W., and Kilvington, S. (2011) Development of a nested PCR for environmental detection of the pathogenic free-living amoeba *Balamuthia mandrillaris*. *J Eukaryot Microbiol* **58**: 269–271.
- Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A., and Kurtz, J.B. (1983) Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg (Lond)* **91**: 167–178.
- Anderson, O.R. (2010) Protozoan ecology. In *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, p. 12. doi:10.1002/9780470015902.a0001929.pub2 <http://www.els.net>.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., and Gilbert, P. (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2420–2425.
- Berger, P., Papazian, L., Drancourt, M., La Scola, B., Auffray, J.P., and Raoult, D. (2006) Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis* **12**: 248–255.
- Bertelli, C., and Greub, G. (2012) Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 110.
- Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S., *et al.* (2002) 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol* **40**: 1621–1625.
- Bui, X.T., Winding, A., Qvortrup, K., Wolff, A., Bang, D.D., and Creuzenet, C. (2012) Survival of *Campylobacter jejuni* in co-culture with *Acanthamoeba castellanii*: role of amoeba-mediated depletion of dissolved oxygen. *Environ Microbiol* **14**: 2034–2047.
- Buse, H.Y., and Ashbolt, N.J. (2012) Counting *Legionella* cells within single amoeba host cells. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2070–2072.
- Calvo, L., Gregorio, I., García, A., Fernández, M.T., Goñi, P., Clavel, A., *et al.* (2013) A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. *Water Res* **47**: 493–502.
- Chang, S.L. (1960) Growth of small free-living amoebae in various bacterial and in bacteria-free cultures. *Can J Microbiol* **6**: 397–405.
- Clark, C.G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D.L., Melito, P.L., Rodgers, F.G., *et al.* (2003) Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg Infect Dis* **9**: 1232–1241.
- Collingro, A., Poppert, S., Heinz, E., Schmitz-Esser, S., Essig, A., Schweiker, T.M., *et al.* (2005) Recovery of an environmental *Chlamydia* strain from activated sludge by co-cultivation with *Acanthamoeba* sp. *Microbiology* **151** (Part 1): 301–309.
- Corsaro, D., and Venditti, D. (2009) Detection of *Chlamydiae* from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. *Res Microbiol* **160**: 547–552.
- Corsaro, D., and Venditti, D. (2010) Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res* **107**: 233–238.
- Corsaro, D., Feroldi, V., Saucedo, G., Ribas, F., Loret, J.F., and Greub, G. (2009) Novel Chlamydiales strains isolated from a water treatment plant. *Environ Microbiol* **11**: 188–200.
- Coulon, C., Eterpi, M., Greub, G., Collignon, A., McDonnell, G., and Thomas, V. (2012) Amoebal host range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental *Chlamydiae* as compared to *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**: 364–373.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W., Cohen, H.K., and Minner, J.R. (1959) Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* **35**: 185–197.
- Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., and Overton, W.M. (1965) The isolation of additional strains of pathogen *Hartmannella* sp. (*Acanthamoeba*): proposed culture method for application to biological material. *Am J Clin Pathol* **43**: 383–387.
- De Jonckheere, J., Van Dijck, P., and Van de Voorde, H. (1975) The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *J Hyg (Lond)* **75**: 7–13.
- De Jonckheere, J.F. (1988) Geographic origin and spread of pathogenic *Naegleria fowleri* deduced from restriction enzyme patterns of repeated DNA. *Biosystems* **21**: 269–275.
- De Jonckheere, J.F., Gryseels, S., and Eddyani, M. (2012) Knowledge of morphology is still required when identifying new amoeba isolates by molecular techniques. *Eur J Protistol* **48**: 178–184.
- Depraitère, C., and Darmon, M. (1978) Growth of '*Dictyostelium discoideum*' on different species of bacteria (author's transl). *Ann Microbiol (Paris)* **129 B**: 451–461.
- Douesnard-Malo, F., and Daigle, F. (2011) Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7640–7646.
- Dreyer, B., Morte, A., Perez-Gilabert, M., and Honrubia, M. (2006) Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method. *Mycol Res* **110**: 887–897.
- Drozanski, W., and Chmielewski, T. (1979) Electron microscopic studies of *Acanthamoeba castellanii* infected with obligate intracellular bacterial parasite. *Acta Microbiol Pol* **28**: 123–133.



- Drozanski, W., and Drozanska, D. (1961) Dead bacteria as a food for Amoebae. *Acta Microbiol Pol* **10**: 379–387.
- Ferrari, B.C., Vesey, G., Davis, K.A., Gauci, M., and Veal, D. (2000) A novel two-color flow cytometric assay for the detection of *Cryptosporidium* in environmental water samples. *Cytometry* **41**: 216–222.
- Finsel, I., Hoffmann, C., and Hilbi, H. (2013) Immuno-magnetic purification of fluorescent *Legionella*-containing vacuoles. *Methods Mol Biol* **983**: 431–433.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R.P., Schleifer, K.H., and Gautom, R.K. (2000) Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2613–2619.
- García, A., Goñi, P., Clavel, A., Lobe, S., Fernandez, M.T., and Ormad, M.P. (2011) Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ Microbiol Rep* **3**: 622–666.
- García, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M.T., Calvo-Beguería, L., Rubio, E., et al. (2013) Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol* **47**: 3132–3140.
- Gast, R.J. (2001) Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol* **48**: 609–615.
- Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuers, P.A., and Byers, T.J. (1996) Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol* **43**: 498–504.
- Gimenez, G., Bertelli, C., Moliner, C., Robert, C., Raoult, D., Fournier, P.E., and Greub, G. (2011) Insight into cross-talk between intra-amoebal pathogens. *BMC Genomics* **12**: 542.
- Gómez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E., and Ares-Mazás, E. (2007) *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol Res* **100**: 1151–1154.
- Gourabathini, P., Brandl, M.T., Redding, K.S., Gunderson, J.H., and Berk, S.G. (2008) Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2518–2525.
- Groscop, J.A., and Brent, M.M. (1964) The effects of selected strains of pigmented microorganisms on small free-living amoebae. *Can J Microbiol* **10**: 579–584.
- Gruden, C., Skerlos, S., and Adriaens, P. (2004) Flow cytometry for microbial sensing in environmental sustainability applications: current status and future prospects. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 37–49.
- Hall, J., and Voelz, H. (1985) Bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* sp. *J Parasitol* **71**: 89–95.
- Henke, M., and Seidel, K.M. (1986) Association between *Legionella pneumophila* and amoebae in water. *Isr J Med Sci* **22**: 690–695.
- Hewett, K.M., Robinson, B.S., Monis, P.T., and Saint, C.P. (2003) Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to a species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool* **42**: 325–332.
- Horn, M., and Wagner, M. (2004) Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol* **51**: 509–514.
- Horn, S., and Schwenzer, B. (1999) Oligonucleotide facilitators enhance the catalytic activity of RNA-cleaving DNA enzymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**: 465–472.
- Jadin, J.B. (1974) Amoeba in water. *Pathol Biol (Paris)* **22**: 81–87.
- Jeon, K.W., and Ahn, T.I. (1978) Temperature sensitivity: a cell character determined by obligate endosymbionts in amoebae. *Science* **202**: 635–637.
- Jeon, K.W., and Hah, J.C. (1977) Effect of chloramphenicol on bacterial endosymbionts in a strain of *Amoeba proteus*. *J Protozool* **24**: 289–293.
- Jeon, K.W., and Jeon, M.S. (1976) Endosymbiosis in amoebae: recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J Cell Physiol* **89**: 337–344.
- Jeon, K.W., and Lorch, I.J. (1967) Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Exp Cell Res* **48**: 236–240.
- Johnson, A.M., Fielke, R., Christy, P.E., Robinson, B., and Baverstock, P.R. (1990) Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *J Gen Microbiol* **136**: 1689–1698.
- Khan, N.A., and Paget, T.A. (2002) Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* **44**: 444–449.
- Kilvington, S., and Price, J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519–525.
- Kilvington, S., Beeching, J.R., and White, D.G. (1991) Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J Clin Microbiol* **29**: 310–314.
- Kron, P., Suda, J., and Husband, B.C. (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **38**: 847–876.
- Kuiper, M.W., Valster, R.M., Wullings, B.A., Boonstr, A.H., Smidt, H., and Van der Kooij, D. (2006) Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5750–5756.
- Landers, P., Kerr, K.G., Rowbotham, T.J., Tipper, J.L., Keig, P.M., Ingham, E., and Denton, M. (2000) Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 121–123.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). New York, NY, USA: John Wiley & Sons, pp. 115–175.
- Le Calvez, T., Trouilhé, M.C., Humeau, P., Moletta-Denat, M., Frère, J., and Héchar, Y. (2012) Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol Cell Probes* **26**: 116–120.
- Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marín, J., Bahaya, Y., Walochnik, J., and Valladares, B. (2007) Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res* **102**: 167–169.
- McLaughlin, G.L., Brandt, F.H., and Visvesvara, G.S. (1988) Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of

- selected *Naegleria* and *Acanthamoeba* amoebae. *J Clin Microbiol* **26**: 1655–1658.
- McLean, J.S., Lombardoa, M.J., Badgera, J.H., Edlunda, A., Novotnya, M., Yee-Greenbauma, J., *et al.* (2013) Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. *PNAS Early Edition* **110**: E2390–E2399. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1219809110>.
- Madarová, L., Trnková, K., Feiková, S., Klement, C., and Obernauerová, M. (2010) A real-time PCR diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri*. *Exp Parasitol* **126**: 37–41.
- Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* **16**: 273–307.
- Marciano-Cabral, F., Jamerson, M., and Kaneshiro, E.S. (2010) Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *J Water Health* **8**: 71–82.
- Muldrow, L.L., Tyndall, R.L., and Fliermans, C.B. (1982) Application of flow cytometry to studies of pathogenic free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1258–1269.
- Nahapetian, K., Challemel, O., Beurtin, D., Dubrou, S., Gounon, P., and Squinazi, F. (1991) The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Res Microbiol* **142**: 677–685.
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., and Jongwutiwes, S. (2010) Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol* **48**: 4636–4640.
- Ochiai, N., Yarbrough, L.D., and Parke, J.L. (2006) Two methods for distinguishing zoospores and cysts of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* **96**: S169–S170.
- Pabst, U., Demuth, J., Gebel, T., and Dunkelberg, H. (1997) Establishment of a method for determining the association between *Legionella* sp. and *Amoeba* sp. using polymerase chain reaction. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **199**: 568–577.
- Page, F.C. (1988) *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. London, UK: Ferry House, Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria.
- Pélandakis, M., and Pernin, P. (2002) Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2061–2065.
- Proca-Ciobanu, M., Lupascu, G.H., Petrovici, A.L., and Ionescu, M.D. (1975) Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol* **5**: 49–56.
- Prorot, A., Chazal, P., and Leprat, P. (2012) Flow cytometry as a powerful tool for monitoring microbial population dynamics in sludge. In *Flow Cytometry – Recent Perspectives*. Schmid, I. (ed.). Rijeka, Croatia: InTech, pp. 43–68. ISBN 978-953-51-0626-5.
- Qvarnstrom, Y., Nerad, T.A., and Visvesvara, G.S. (2013) Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol* **60**: 626–633.
- Rowbotham, T.J. (1981) Pontiac fever, amoebae, and legionellae. *Lancet* **1**: 40–41.
- Rowbotham, T.J. (1983) Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol* **36**: 978–986.
- Salah, I.B., Ghigo, E., and Drancourt, M. (2009) Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* **15**: 894–905.
- Scheid, P.L., and Schwarzenberger, R. (2011) Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitol Res* **109**: 499–504.
- Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., *et al.* (2001) Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* **39**: 1903–1911.
- Schuster, F.L. (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **15**: 342–354.
- Singh, B.N. (1946) A method of estimating the numbers of soil protozoa, especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria. *Ann Appl Biol* **33**: 112–119.
- Skinner, A.R., Anand, C.M., Malic, A., and Kurtz, J.B. (1983) *Acanthamoebae and environmental spread of Legionella pneumophila*. *Lancet* **2**: 289–290.
- Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., *et al.* (1998) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* **45**: 45–54.
- Stothard, D.R., Hay, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Seal, D.V., and Byers, T.J. (1999) Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol* **37**: 2687–2693.
- Suzan-Monti, M., La Scola, B., Barrassi, L., Espinosa, L., and Raoult, D. (2007) Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *PLoS ONE* **2**: e328.
- Taylor, S.J., Ahonen, L.J., de Leij, F.A., and Dale, J.W. (2003) Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4316–4319.
- Thom, S., Warhurst, D., and Drasar, B.S. (1992) Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol* **36**: 303–306.
- Thomas, C., Hill, D.J., and Mabey, M. (1999) Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *J Appl Microbiol* **86**: 1024–1032.
- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., *et al.* (2004) The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* **92**: 405–413.
- Tyndall, R.L., and Domingue, E.L. (1982) Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* **44**: 954–959.

- Upadhyay, J.M. (1968) Growth and bacteriolytic activity of a soil amoeba, *Hartmannella glabrae*. *J Bacteriol* **95**: 771–774.
- Vandenesch, F., Surgot, M., Bornstein, N., Paucod, J.C., Marmet, D., Isoard, P., and Fleurette, J. (1990) Relationship between free amoeba and *Legionella*: studies *in vitro* and *in vivo*. *Zentralbl Bakteriol* **272**: 265–275, 76.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., and Caron, G.N. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 429–448.
- Vodkin, M.H., Howe, D.K., Visvesvara, G.S., and McLaughlin, G.L. (1992) Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J Protozool* **39**: 378–385.
- Wallner, G., Fuschs, G.B., Spring, S., Beisker, W., and Amann, R. (1997) Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4223–4231.
- Xuan, Y.H., Yu, H.S., Jeong, H.J., Seol, S.Y., Chung, D.I., and Kong, H.H. (2007) Molecular characterization of bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* isolates from infected corneas of Korean patients. *Korean J Parasitol* **45**: 1–9.
- Yousuf, F.A., Siddiqui, R., and Khan, N.A. (2013) *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasit Vectors* **6**: 169.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

# A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae

L. Calvo<sup>a,b</sup>, I. Gregorio<sup>a,b</sup>, A. García<sup>c</sup>, M.T. Fernández<sup>c</sup>, P. Goñi<sup>c</sup>, A. Clavel<sup>c</sup>,  
M.L. Peleato<sup>a,b</sup>, M.F. Fillat<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>b</sup>Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Mariano Esquillor, Edificio I + D, 50018 Zaragoza, Spain

<sup>c</sup>Area of Parasitology, Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, C/Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 March 2012

Received in revised form

19 September 2012

Accepted 21 September 2012

Available online 29 October 2012

### Keywords:

Amoebae resistant pathogens

*Legionella*

*Mycobacterium*

*Pseudomonas*

*Vibrio*

*Microcystis*

## ABSTRACT

Changes in water use and anthropogenic activity have major impacts on the quality of natural aquatic ecosystems, water distribution and wastewater plants. One of the main problems is the presence of some pathogenic microorganisms that are resistant to disinfection procedures when they are hosted by free living amoeba and that in many cases are hardly detectable by culture-based procedures. In this work we report a sensitive, low-cost procedure consisting of a pentaplex-nested PCR that allows simultaneous detection of *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio cholerae* and the microcystin-producing cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. The method has been used to detect the presence of these pathogenic bacteria in water and inside free living amoeba. Its validation in 72 samples obtained from different water sources from Aragon (Spain) evidences that *Mycobacterium* and *Pseudomonas* spp are prevailing as amoeba-resistant bacteria.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Free living amoebae (FLA) are ubiquitous protozoa present in a wide range of habitats including soils, air, biofilms and natural or anthropogenic water sources. The appearance of several pathogenic amoeba belonging to the *Acanthamoeba*, *Naegleria* and, to a lesser extent, *Hartmannella* genera has been reported in drinking water, cooling towers, recreational waters and hospital water networks (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Greub et al., 2004). Among the most widespread, *Acanthamoeba* spp. is able to infect the skin and the lungs producing

disseminated infections in susceptible hosts, but is more frequently a cause of keratitis associated with the use of contact lenses. *Naegleria fowleri* is one of the main responsible of primary amoebic meningoencephalitis (Hannisch and Hallagan, 1997). Moreover, a few cases of keratitis and severe infections in the central nervous system caused by *Hartmannella* spp. have been reported (Visvesvara, 2010). Most FLA have at least two developmental stages: a trophozoite, the vegetative form, and cysts or resistant forms that are induced by adverse conditions and are resistant to classical disinfection methods (Thomas and Ashbolt, 2011). In addition, some

\* Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976761282; fax: +34 976762123.

E-mail address: [fillat@unizar.es](mailto:fillat@unizar.es) (M.F. Fillat).

0043-1354/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.039>

FLA such as *Acanthamoeba* (García et al., 2011) are very tolerant to high temperatures and osmolarity, and they can thus represent a major health risk in terms of water quality. In many cases, amoeba are vectors for resistant *Legionellaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, as well as some toxigenic cyanobacteria, among other potential pathogens, increasing in some cases the virulence of those endosymbionts (Greub et al., 2004; Thomas and Ashbolt, 2011; Manage and Nakano, 2004). Moreover, amoeba hosts prevent bacterial detection by classical microbiological techniques, allowing re-colonization of artificial water systems after sanitation treatment (Storey et al., 2004).

The increased incidence of nosocomial *Legionella* outbreaks in recent years has led to the development of efficient molecular methods for the identification of free and amoeba-associated *Legionella* spp. (Miyamoto et al., 1997; Horng et al., 2006). In addition to legionellosis, other diseases produced by amoeba-resistant pathogens, such as those caused by *Mycobacterium* spp. and *Pseudomonas* spp., have become more widespread in the last few years due to their prevalence in aquatic ecosystems. Non tuberculous mycobacteria have been detected in natural water sources as well as in samples obtained from municipal water treatment plants and homes, reaching rates varying from 60% to 100% in water from hospitals and haemodialysis and dental offices (Adekambi et al., 2006; Pagnier et al., 2009; Phillip and von Reyn, 2001). The occurrence of *Pseudomonas* spp is common in aquatic environments including recreational waters, and this has also become increasingly recognized as an emerging opportunistic pathogen of clinical relevance. Because of the intrinsic antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. and the emerging multidrug-resistant strains, its presence in a recreational environment may be an important risk for immune-suppressed or other individuals, for whom treatment difficulties have greater implications (Craun et al., 2005; Lutz and Lee, 2011). Moreover, in developing countries, the presence of *Vibrio cholerae* is still a major public health concern (Fazil and Singh, 2011). The ability of several *Acanthamoeba* species to host *V. cholerae* O1 and O139, the causative agent of cholera, and the presence of both microorganisms in aquatic environments and in drinking water in cholera-endemic areas makes the control of this pathogen more difficult to achieve (Greub et al., 2004).

The increasing eutrophication of freshwater ecosystems is undoubtedly linked to the presence of free living amoebae in diverse environments co-existing with phytoplankton and recurrent cyanobacterial blooms, where the toxigenic *Microcystis aeruginosa* is one of the predominant cyanobacteria (Yuichiro et al., 2004; Liu Xinyao et al., 2006). Under certain conditions not yet well understood, some *Microcystis* strains produce the hepatotoxin microcystin, a cyclic heptapeptide that specifically inhibits the eukaryotic protein phosphatases 1 and 2A (Dittmann and Wiegand, 2006). The analysis of trophic interactions between amoeba and *Microcystis* spp. will provide useful information about the influence of amoebal grazers on toxicity and the genetic structure of *Microcystis* blooms (Nishibe et al., 2004; Van Wichelen et al., 2010).

This underlines the need to develop rational strategies for the detection and control of harmful amoeba-resistant bacteria. Although PCR-based detection has been a widely used approach, most published reports are limited to the identification of single individual amoeba-associated genus

pathogens (Miyamoto et al., 1997; Horng et al., 2006; Adekambi et al., 2006). However, it is quite common for several of these pathogenic bacteria to co-exist in the same host, representing a potential health risk and impairing water quality (Corsaro et al., 2010). It should also be taken into account that classical methods of identification based on microbial cultures are slow and, in some cases, laboratories equipped with biosafety facilities of level 2 or higher are required for the correct handling of such pathogenic cultures. Therefore, it is essential to make available new procedures suitable not only for advanced research centres but also for public health laboratories in small villages with poor equipment or those in developing countries. In this work, we present the development of a coupled PCR-based method for the simultaneous detection of five pathogenic bacteria in FLA. This is a specific, low-cost sensitive procedure that has been optimised and validated using 72 environmental samples from ornamental fountains, natural aquatic environments and sewage waters from Aragon (Spain), revealing a high occurrence of *Mycobacterium* and *Pseudomonas* spp.

---

## 2. Materials and methods

### 2.1. Enzymes and chemicals

Taq polymerase and dNTPs were supplied by Biotools. Primers were purchased from Invitrogen and Biomers. The chemicals for the buffer preparation and the BG11 medium for cyanobacteria were supplied by Sigma, and Luria broth by Difco. All other chemicals were reagent grade.

### 2.2. Reference bacterial strains

Reference strains used as positive controls and for optimization of the coupled PCR procedure were *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 from the Pasteur Culture Collection, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv from the Clinic Hospital Lozano Blesa, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Legionella pneumophila* Philadelphia-1, from the Medicine Faculty Collection (University of Zaragoza) and *V. cholerae* CECT 512. Cultures of *Microcystis* were performed in BG11 as described in (Sevilla et al., 2008), while *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* and *Vibrio* strains were grown in BCYE medium (CO<sub>2</sub> atmosphere, 37 °C, 48 h), Lowenstein Jensen medium, Mueller-Hinton Agar (37 °C, 24 h) and LB medium (37 °C, 24 h), respectively.

### 2.3. Environmental water samples

1 L samples were taken from different natural and anthropogenic water sources in Aragón (Spain) from January 2010 to August 2011 by the Aragón Government Institute of Public Health, in accordance with ISO standard 5667-2:1991. A total of 72 samples (Table 1) were processed as follows. Duplicates of 50 ml from each water sample were concentrated 100 times by centrifugation at 3000 × *g* for 20 min. Each sample was processed with a filtration ramp using the Microfil® Filtration Funnels kit with S-pack™ and 0.7 μm Millipore sterile filters collecting cells in a final volume of 500 μl. Amoebae from each sample were cultivated onto non-nutritive agar (NNA) at 30 °C

**Table 1 – Results of the detection of pathogenic bacteria in field samples.**

Source	Sample	Microorganisms identified
Swamp 1	1.1	<i>Mycobacterium</i> spp.
	1.2	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	1.3	<i>Mycobacterium</i> spp.
	1.4	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	1.5	–
	1.6	–
	1.7	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	1.8	–
	1.9	–
	Swamp 2	2.1
2.2		<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
2.3		<i>Mycobacterium</i> sp.
2.4		–
2.5		<i>Mycobacterium</i> spp.
2.6		<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
2.7		<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
2.8		<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
2.9		<i>Mycobacterium</i> spp.
2.10		–
2.11		<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Legionella pneumophila</i>
2.12	–	
2.13	<i>L. pneumophila</i>	
2.14	–	
2.15	–	
Swamp 3	3.1	<i>L. pneumophila</i>
	3.2	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Cyanobacterias tóxicas</i>
	3.3	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	3.4	<i>Pseudomonas</i> spp.
	3.5	–
	3.6	<i>Pseudomonas</i> spp.
	3.7	–
	3.8	–
	3.9	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	3.10	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
3.11	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	
3.12	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	
3.13	<i>L. pneumophila</i>	
3.14	<i>Mycobacterium</i> spp.	
Treatment plant	1	<i>Mycobacterium</i> spp.
	2	–
	3	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	4	–
	5	–
	6	<i>L. pneumophila</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.
	7	<i>L. pneumophila</i>
	8	–

**Table 1 (continued)**

Source	Sample	Microorganisms identified
Ornamental fountain	9	<i>L. pneumophila</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.
	10	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	11	<i>Mycobacterium</i> spp.
	1	–
	2	<i>Pseudomonas</i> spp.
	3	–
	4	–
	5	<i>Mycobacterium</i> spp.
	6	–
	7	<i>Pseudomonas</i> spp.
	8	<i>Pseudomonas</i> spp.
	9	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
	10	–
	11	–
	12	–
	13	<i>Mycobacterium</i> spp.
14	<i>Mycobacterium</i> spp.	
15	<i>Mycobacterium</i> spp.	
16	<i>Pseudomonas</i> spp.	
Other samples:		
Well	1	<i>Mycobacterium</i> spp.
Swamp 4	2	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
Sewage water	3	<i>Mycobacterium</i> spp.
Public toilet tap water	4	–
Sanitary hot water	5	–
Clinical sample 1	6	<i>Pseudomonas</i> spp.
Clinical sample 2	7	–

with preheated *E. coli* for 7 days and then subcultures were performed on fresh NNA.

Since no citations found thereon, it has been considered that four subcultures amoebae on *E. coli*-coated plates, provided a sufficiently clean environment to assume that other bacteria detected by PCR can be defined operationally as amoebal endosymbiont. Therefore, after four subcultures, the total DNA was extracted from the amoebae species as described previously (Ausubel, 1993). Naturally harboured bacteria were detected by using the multiplex-nested PCR described below.

## 2.4. PCR analyses

### 2.4.1. Sample preparation

Genomic DNAs from the reference *Legionella* strains, from *M. tuberculosis* H37Rv30, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *V. cholerae* CECT 512 were isolated with an IBIAN® DNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations. Isolation of DNA from *M. aeruginosa* PCC 7806 was performed according to a previously described procedure (Neilan et al., 1999). DNAs from field samples were obtained as indicated in Section 2.3 and kept at –20 °C until analysis.

## 2.4.2. Multiplex PCR

**2.4.2.1. Target genes and primer design.** To simultaneously detect the presence of the five pathogens, specific target genes were chosen to design primers allowing the amplification of fragments whose resulting sizes exhibited at least a difference of 80 bp (Table 2). The primers were designed using Amplify 2.0 in order to avoid hairpin structures and dimer formation. The differences in melting temperatures were minimized as much as possible. The specificity of each primer was analysed using BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). All primers were purchased from Biomers.

**2.4.2.2. Procedure.** The multiplex PCR was carefully performed with sterile gloves and filter tips to avoid contamination. The 10-primer mixture was prepared in advance and diluted with sterile water to ten times its optimal concentration in each case and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in aliquots to be used only once. The PCR was performed in a final volume of 25  $\mu\text{l}$  containing 3  $\mu\text{l}$  of sample, buffer 1 $\times$  (Biotools), 1.5 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM of each dNTP, 0.15 units of Taq DNA polymerase and the corresponding primers (see Table 2). The reaction mixture was initially denatured at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min and then amplified for 25 cycles with denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min, annealing at  $45^{\circ}\text{C}$  for 1 min, extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min.

## 2.4.3. Nested PCR

Primers for the nested PCR were chosen to produce amplification fragments whose resulting sizes exhibited at least a difference of 80 bp. 5  $\mu\text{l}$  of the amplification product obtained from the multiplex PCR were diluted 1:10 with Milli-Q sterile water, and a 5  $\mu\text{l}$ -aliquot was used as a template for the nested PCR performed in a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . The reaction mixture was initially denatured at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min and then amplified for 20 cycles with denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min, annealing at  $48^{\circ}\text{C}$  for 1 min, extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min.

The results were monitored in a 2% agarose gel stained with SyBrSafe using  $\Phi\text{X174 Hae III}$  as molecular weight marker and analysed in a Gel-Doc (BioRad).

## 2.4.4. Controls for PCR inhibitors

When no bands were observed in a sample, it was tested for the presence of PCR inhibitors. Controls were performed running the first step of the PCR after adding as template

a mixture of extracted DNAs from the reference bacterial strains containing 20 pg of each source.

## 2.5. Detection limit

The detection limit was considered as the lowest amount of DNA used to produce the observable amplified DNA products from the agarose gel electrophoresis stained with SyBrSafe dye. The correlation of this amount of DNA to the cell number was performed considering genome sizes of 3.9, 4.4, 6.3, 2.5 and 6.0 Mb for *L. pneumophila*, *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *V. cholerae* and *M. aeruginosa*, respectively. The detection limit of the first pentaplex PCR and the coupled nested PCR were determined by using a series of diluted chromosomal DNAs from the five pathogenic organisms as templates. The results of the reactions were evaluated in 2% agarose gel electrophoresis and the analysis of gels with a GelDoc 2000 (BioRad) and MultiAnalyst 1.1 Program (BioRad Laboratories, 1997).

## 2.6. Sequencing and data analyses

A selection of amplification products was sequenced using the sequencing facilities at the University of Zaragoza. Analysis of the DNA sequences was performed with the Chromas Lite program and compared to those present in GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) using ClustalX.

## 3. Results

### 3.1. Development and optimization of the pentaplex PCR

Initially, several trials combining the amplification of different genes from the five bacteria under study were performed. The results from these assays indicated that the best set of genes to detect simultaneously the five pathogenic bacteria were the following: the *mip* gene from *L. pneumophila*, a species-specific gene whose product is required for the intracellular infection of protozoa and macrophages (Cianciotto and Fields, 1992), the outer membrane protein *ompU* from *Vibrio cholerae*, a widely used marker for this pathogen that is involved in the attachment to the host cells and colonization of the intestine (Nakasone and Iwanaga, 1998), *hsp65* heat shock protein 65, a major antigen of mycobacteria that is specific for *Mycobacterium* spp. and that has been shown to be very useful

**Table 2 – Primers used for gene amplification in the first pentaplex PCR.**

Target bacteria	Primer designation	Sequences 5' → 3'	Product size (bp)	Reference
<i>Legionella pneumophila</i>	Mip-Leg186-F	GCA TTG GTG CCG ATT TGG	186	(Roch and Maurin, 2005)
	Mip-Leg186-R	GYT TTG CAT CAA ATC TTT CTG AA		
Toxicogenic cyanobacteria	McyD-fow	GAG CAT TAA GGG CTA AAT CG	282	This work
	McyD-rev	CTT GGT TGC TTC ATC AAC TC		
<i>Mycobacterium</i> spp.	Hsp65-dir	CCC GTA CGA GAA GAT CGG	354	This work
	Hsp65-dir	GAC TCC TCG ACG GTG ATG		
<i>Pseudomonas</i> spp.	R16S-dir	GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT	962	This work
	R16S-rev	TCT GTA CCG ACC ATT GTA GC		
<i>Vibrio cholerae</i>	OmpU-dir	GCT GAC GGA ATC AAC CAA AG	869	(Rivera et al., 2001)
	OmpU-rev	CGG AAG TTT GGC TTG AAG TAG		



**Table 3 – Detection limits of the pentaplex and nested PCRs.**

Source species	Pentaplex PCR		Coupled to nested
	Minimum template DNA	Number of cells detected	Minimum template DNA
<i>Vibrio cholerae</i>	10 pg	3704	1 fg
<i>Microcystis aeruginosa</i>	10 pg	217	1 fg
<i>Legionella pneumophila</i>	10 pg	2272	0.1 fg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 pg	1439	1 fg
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10 pg	2083	1 fg

for its identification (da Silva Rocha et al., 1999; Bhattacharya et al., 2003), the 16S ribosomal RNA gene from *Pseudomonas* spp (Locatelli et al., 2002), and amplification of *mcyD* encoding a  $\beta$ -ketoacyl synthase (KS) involved in the synthesis of microcystin (Tillett et al., 2000) which was chosen to detect *M. aeruginosa*.

Table 2 shows the sequences and main properties of the set of primers that were used for the multiplex PCR. The optimal amplification required in order to detect the five pathogenic bacteria *L. pneumophila*, *V. cholerae*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., and *M. aeruginosa* was achieved using 0.75  $\mu$ M Mip-Leg186-F, Mip-Leg186R, OmpU-dir and OmpU-rev primers, 0.5  $\mu$ M McyD-fow and McyD-rev and 1  $\mu$ M Hsp65-dir, Hsp65-rev, R16S-dir, R16S-rev, 0.5 mM dNTPs and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Optimal annealing occurred at 45 °C. The samples were subjected to 25 cycles of amplification as described in Section 2.4.2.2.

### 3.2. Detection limit of the first-step pentaplex PCR

In order to determine the sensitivity of the multiplex PCR, several assays were carried out using serialised dilutions of purified chromosomal DNAs from the five pathogenic bacteria as templates. Table 3 indicates that the lowest detection threshold for each bacteria after 25 cycles of amplification was around 10 pg of DNA, ranging from 3704 cells for *V. cholerae* to 217 cells for *M. aeruginosa*.

### 3.3. Optimal coupling to nested PCR allows detection of femtograms of DNA

Since the sensitivity of the first multiplex PCR was too low to be used in field samples, reamplification of the product using a set of nested primers was performed (Table 4). Optimal detection of the pathogenic bacteria was achieved using 5  $\mu$ l of a 1:10 dilution of the product of a 25-cycle multiplex PCR as template (Fig. 1). Nested PCR was carried out in a final volume of 25  $\mu$ l using 0.75  $\mu$ M NMip-dir and SNMip-rev primers, 0.5  $\mu$ M NMcyD-dir and NMcyD-rev and 1  $\mu$ M NHsp65-dir, NHsp65-rev, NR16S-dir and NR16S-rev, 0.75  $\mu$ M NOmpU-dir and NOmpU-rev. In this case, optimal annealing occurred at 48 °C when the samples were subjected to 20 cycles of amplification as described in Section 2.4.3. Coupling both amplification reactions (pentaplex PCR and nested PCR) decreases the detection limit from four to five orders of magnitude, since a minimum of 1 femtogram of each *V. cholerae*, *M. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. and *Mycobacterium* spp. DNA was detected, while the presence of 0.1 fg of *Legionella pneumoniae mip* gene was clearly visible on the gel (Fig. 2 and Table 3).

### 3.4. Specificity of the assay

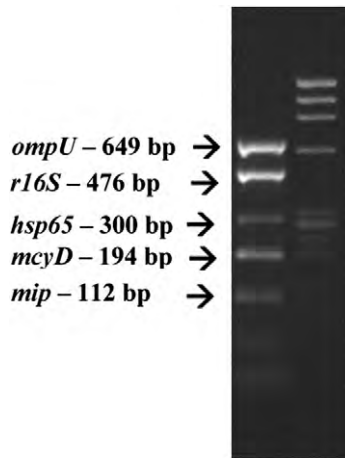
The specificity of the assay for the desired targets was investigated using as templates DNAs isolated from other ubiquitous and potentially pathogenic bacteria such as *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, as well as pathogen-free amoebal DNA. No spurious amplification products were detected in any case. When different cyanobacteria were used to monitor the specificity of the assay, non-toxic *Microcystis* spp., such as *Microcystis aeruginosa* PCC 7005, also yielded an amplification product consistent with the presence of a non functional *mcy* locus in this cyanobacteria, while no signals were detected when cyanobacterial cultures of *Synechocystis* PCC 6803 or *Nostoc* PCC 6719 were analysed (data not shown).

### 3.5. *Mycobacterium* and *Pseudomonas* spp. are prevailing amoebae-resistant microorganisms in ornamental fountains, water reservoirs and sewage treatment plants in Aragon

The procedure was successfully used using amoebal DNA. In order to examine the distribution of these pathogenic bacteria inside free-living amoeba present in aquatic ecosystems in

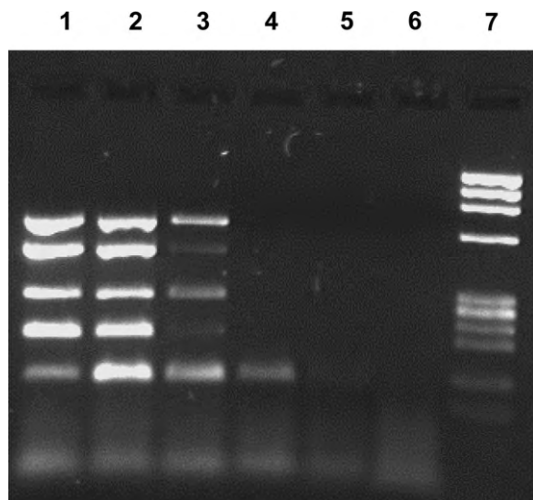
**Table 4 – Characteristics of the primers used in the nested PCR.**

Target bacteria	Primer	Sequences 5' → 3'	Product (pb)	Reference
<i>Legionella pneumophila</i>	N-Mip-dir	GAA GCA ATG GCT AAA GGC ATG CAA	112	This work
	SN-Mip-rev	GCT TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA ACT TG		
<i>Microcystis</i> spp.	N-McyD-dir	TCA TAG CCC CAT ATC CTT TAG CGG C	194	This work
	N-McyD-rev	CTG CTG TAT CTT TAA TTG GCT CGG C		
<i>Mycobacterium</i> spp.	N-Hsp65-dir	GAG CTG GTC AAG GAA GTC GCC	300	This work
	N-Hsp65-rev	GTT GCC GAC CTT GTC CAT CGG		
<i>Pseudomonas</i> spp.	N-R16S-dir	GAC GTT ACC GAC AGA ATA AGC ACC G	476	This work
	N-R16S-rev	ACC CAC ATG CTC CAC CGC TTG TG		
<i>Vibrio cholerae</i>	N-OmpU-dir	CAG GTT CAA CCG TTT ACA GCG CG	649	This work
	N-OmpU-rev	GCG AAG TAC AGG TTT TCC ATG CGG		



**Fig. 1** – Detection of *mcyD* (194 bp), *mip* (112 bp), *hsp65* (300 bp), *R16S* (476 bp) and *ompU* (649 bp) genes after amplification using the pentaplex-PCR coupled to the nested PCR. Lane 1: amplification product of a sample consisting of 10 pg of *V. cholerae* CECT 512 DNA, 10 pg of *M. aeruginosa* PGC 7806 DNA, 10 pg of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv DNA, 25 pg of *L. pneumophila* Philadelphia 1 DNA and 20 pg of *P. aeruginosa* ATCC 27853 DNA. lane 2:  $\Phi$  *Hae* III MW marker.

Aragon, 72 amoebal DNA samples isolated from different water sources were used for validation of the method (Table 1). Three main water reservoirs (swamps) were studied taking samples periodically over 12 months. From these swamps a total of 38 samples were analysed. In addition, samples from different ornamental fountains (16) and sewage treatment plants (11) as well as other samples taken from domestic water supplies, wells and drinking water plants (7)



**Fig. 2** – Agarose gel electrophoresis showing the detection limit of the pentaplex multiplex coupled to nested amplification. Lanes 1 to 6 show the amplification of  $10^{-13}$  to  $10^{-18}$  g of DNA from each microorganism. Lane 7:  $\Phi$  *Hae* III MW marker.

were analysed. Fig. 3 shows an example of the results obtained when amoebal DNAs isolated from swamp water samples were analysed. The results presented in Table 1 as well as in Fig. 4 show a higher presence of *Mycobacterium* spp., that was detected in 36.9% of the samples, followed by *Pseudomonas* spp. (26.1%), *L. pneumophila* (7.6%) and toxigenic cyanobacteria (1.1%), while *V. cholerae* was absent in all the samples analysed.

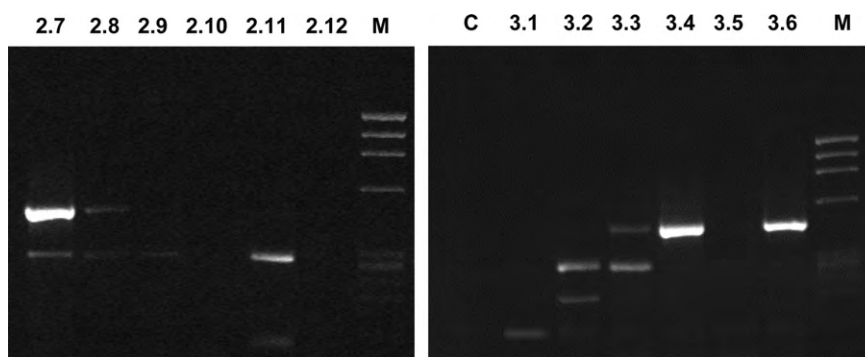
Sequencing a selection of amplification products (Table 5) shows the occurrence of diverse mycobacterial species, namely *Mycobacterium mucogenicum*, *M. goodii* and *Mycobacterium chelonae*, among others, while pseudomonads belonging to the *mendocina* species were also found.

#### 4. Discussion

The ubiquity of free living amoeba is a serious concern not only because of their potential virulence but also because they are reservoirs for resistant pathogenic bacteria that survive chlorination and other disinfection treatments inside their hosts. They are then undetectable by classical microbiological methods. After biocide treatment, under favourable environmental conditions these infectious bacteria are released into water and thus represent a health risk.

This work presents a reliable and simple methodology for the simultaneous detection of five problematic pathogenic bacteria masked inside free living amoeba. Our aim was to develop a sensitive and cheap method affordable for most laboratories including those from developing countries which may lack sophisticated equipment and where water quality remains an issue. However, it should be highlighted the importance of performing exhaustive negative controls in order to minimize potential false positive samples, a potential weakness of nested PCR applications.

Among amoeba-resistant pathogens, *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. and pseudomonads have been reported as being the most ubiquitous and responsible for waterborne diseases (Declerck et al., 2007; Adekambi et al., 2006; Covert et al., 1999; September et al., 2007). Since *L. pneumophila* is responsible for more than 90% of human legionellosis (Yanez et al., 2005) and has been the cause of severe outbreaks of this disease in several Spanish cities in recent years (Zucs, 2011) (European Centre for Disease Prevention and Control), our method aims specifically to identify *L. pneumophila* through the amplification of the *mip* gene. Although *mip*-like genes are present throughout the *Legionella* genus, the *mip* gene itself is only present in the *L. pneumophila* genome. It has been chosen by several authors for the detection of this pathogen in water (Bej et al., 1991; Declerck et al., 2007). Usually, q-RT-PCR or PCR coupled to other techniques such as immunochromatography tests have been used for this detection (Hornig et al., 2006). Amplification of the *mip* gene is also the basis of a commercial kit developed by Perkin-Elmer-Cetus for the detection of *L. pneumophila* in environmental specimens. The kit has also been successfully used with clinical isolates (Matsiota-Bernard et al., 1994). It is noticeable that the detection limit using these more accurate methods is in the same order of magnitude as the procedure presented in this work. However, our aim is not to obtain an exact quantification of cells present



**Fig. 3 – Examples of electrophoretic analysis of amoebal DNAs by multiplex-nested PCR from swamps 2 and 3. Left panel: Samples 2.7. and 2.8. indicating the presence of DNAs from *Pseudomonas* and *Mycobacterium* spp., Sample 2.9 shows the amplification of *Mycobacterium* spp DNA, Sample 2.10 and 2.12 are negative, and sample 1.11 shows the presence of *Mycobacterium* spp and *L. pneumophila* DNAs. Right: Lane 1: negative control, lane 2: presence of DNA from *L. pneumophila* in Sample 3.1, Sample 3.2 shows the presence of *Mycobacterium* spp and *Microcystis* spp., Sample 3.3 contains DNA from *Mycobacterium* and *Pseudomonas* spp., Samples 3.4 and 3.6 showing DNA from *Pseudomonas* spp., Sample 3.5 is negative. M:  $\Phi$  Hae III MW marker.**

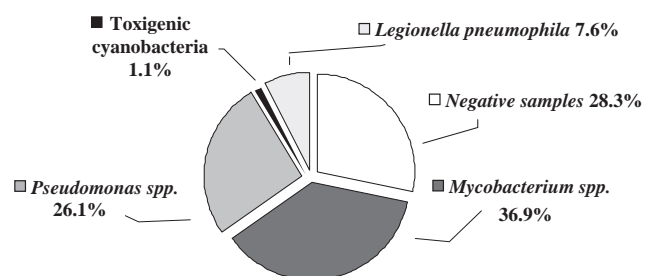
inside amoeba, but rather to provide an indicator of the presence of a problematic group of pathogens.

Pseudomonads are also very frequent in natural and recreational waters, being the first cause of hot tub folliculitis and otitis externa (Lutz and Lee, 2011). *Pseudomonas* spp. has also been reported to be involved in queratitis and fatal pneumonia (Huhulescu et al., 2011), among other diseases. Its presence may have a great impact on immune-suppressed individuals since around 96% of the pseudomonads isolated from hot tubs and indoor swimming pools in a surveillance study display antimicrobial resistance (Lutz JK and Lee J, 2011). Therefore, their prevalence in the environment, non only in recreational water but as part of biofilms in drinking water distribution systems, as well as their relevancy in human pathogenicity lead us to seek for its occurrence in amoeba hosts.

Although cyanobacteria are less of a health hazard than pathogens such as *Pseudomonas* or *L. pneumophila*, continuous or prolonged exposure at high concentration of microcystins causes cumulative liver damage leading to chronic human injury and tumour promotion (de Figueiredo et al., 2004). In this work, coupling of a multiplex PCR to a nested amplification allows the detection of those microorganisms with a high sensitivity, being the highest in the case of *mcyD*-containing cyanobacteria. It should be noticed that amplification of this gene alerts of the presence of potential toxigenic

cyanobacteria, namely microcystin-producing, but other non-toxic cyanobacterial strains carrying a *mcyD* gene, such as *Microcystis* PCC 7005, are also detected. On the other hand, microcystin production is influenced by a number of nutritional and environmental factors, such as nitrate and iron availability (Sevilla et al., 2010; Sevilla et al., 2008), among others. Therefore, in the case of samples rendering positive for *mcyD*, further analysis is advisable (i.e. inhibition of protein phosphatase activity or ELISA) (Carmichael and An, 1999).

The assays carried out with our field samples point to *Mycobacterium* spp. as one of the most frequent pathogens in water and amoeba hosts (Covert et al., 1999), followed by pseudomonads. Due to the difficulty of isolating mycobacteria, published results concerning their occurrence in environmental samples underestimate the reality, since epidemiologic studies suggest that natural or drinking water are the main source of human contamination (Dailloux et al.,



**Fig. 4 – Percentage distribution of the bacteria detected in the 72 field samples.**

**Table 5 – Identification of amplification products (Table 1) by sequencing and sequence alignment with Genbank.**

Source	Microorganisms identified
<b>Reservoirs</b>	
1.1 - Swamp 1	<i>Mycobacterium</i> sp.
1.4 - Swamp 1	<i>M. mucogenicum</i>
2.3 - Swamp 2	<i>M. goodii</i>
3.2 - Swamp 3	<i>Mycobacterium</i> sp.
3.3 - Swamp 3	<i>Mycobacterium</i> sp.
3.4 - Swamp 3	<i>P. mendocina</i>
<b>Treatment plants</b>	
3	<i>Mycobacterium</i> sp.
9	<i>Mycobacterium</i> sp.
<b>Other samples</b>	
1 - Well	<i>M. chelonae</i>
2 - Water treatment plant	1 <i>Mycobacterium</i> sp.
3 - Sewage water	<i>Mycobacterium</i> sp.

1999). Among the species identified in this work, *M. chelonae* has often been associated with nosocomial infections (Phillip and von Reyn, 2001; Burns et al., 1991; Wallace et al., 1993; Sbidian et al., 2010) and has also been identified in recirculating aquaculture systems as a potential cause of disease in fish (Yanong et al., 2010). Other mycobacteria here identified belong to the *mucogenicum*, *goodii* and *chelonae* species, also reported as emergent pathogens (Adekambi, 2009; Brown et al., 1999).

Among the amoebal samples analysed using our procedure, 63.9% resulted positives for at least one of the endosymbionts tested. This rate is only slightly higher to the 59.4% reported by Iovieno (Iovieno et al., 2010) also using a PCR-based assay. However, the percentages of infected amoeba found using amoebal co-culture assays (24–26%) (Thomas et al., 2008) or confocal laser-scanning microscopy (16%) (Fritsche et al., 1999) were much lower than those detected when amplification techniques are used.

In addition to the bacteria identified in this work, the presence of other pathogenic amoebal endosymbionts in our water samples cannot be discarded. *Acanthamoeba* spp. are also potential reservoirs of Chlamydiales (Corsaro and Venditti, 2009), *Campylobacter jejuni* (Axelsson-Olsson et al., 2005) or *Salmonella enterica* serovar Typhi (Douesnard-Malo and Daigle, 2011), among other problematic pathogens. Thus, the development of a more general assay including their detection will undoubtedly contribute to improve diagnosis from water samples.

Although there is a general concern about the importance of resistant pathogens in amoeba hosts, little is known about the influence of amoeba on the virulence of these bacteria. Further work should be done to address this issue, as well as to understand the consequences of the potential interactions between such pathogens (i.e. cyanotoxin or other virulence factors produced in the presence of other microorganisms). The method reported in this work highlights the prevalence of *Mycobacterium* spp. and *Pseudomonas* spp. associated to free living amoeba in different water environments.

## 5. Conclusion

The design and optimization of a pentaplex-nested PCR assay allows the simultaneous detection of five pathogenic bacteria causing serious health concerns. Validation of the procedure in 72 water samples taken from different sources in Aragón evidences that *Mycobacterium* and *Pseudomonas* spp. are dominant amoeba-resistant pathogens.

## Acknowledgements

This work has been supported by grant BFU2009-07424 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), and grant 2009/0372 from the Diputación General de Aragón (Obra Social La Caixa). The authors thank Dr. A. Victoria from the University Hospital Lozano Blesa, Zaragoza, and the Aragon Government Institute of Public Health for the sample collection.

## REFERENCES

- Adekambi, T., 2009. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (10), 911–918.
- Adekambi, T., Ben Salah, S., Khelif, M., Raoult, D., Drancourt, M., 2006. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 5974–5981.
- Ausubel, F., 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc.
- Axelsson-Olsson, D., Waldenström, J., Broman, T., Olsen, B., Holmberg, M., 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2), 987–992.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M., 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (2), 597–600.
- Bhattacharya, B., Karak, K., Ghosal, A.G., Roy, A., Das, S., Dandapat, P., Khetawat, D., Mondal, D.K., Bhattacharya, S., Chakrabarti, S., 2003. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Tropical Medicine and International Health* 8 (2), 150–157.
- Brown, B.A., Springer, B., Steingrube, V.A., Wilson, R.W., Pfyffer, G.E., Garcia, M.J., Menendez, M.C., Rodriguez-Salgado, B., Jost Jr., K.C., Chiu, S.H., Onyi, G.O., Bottger, E.C., Wallace Jr., R.J., 1999. *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 (Pt 4), 1493–1511.
- Burns, D.N., Wallace Jr., R.J., Schultz, M.E., Zhang, Y.S., Zubairi, S.Q., Pang, Y.J., Gibert, C.L., Brown, B.A., Noel, E.S., Gordin, F.M., 1991. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *American Review of Respiratory Disease* 144 (5), 1153–1159.
- Carmichael, W.W., An, J., 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins* 7 (6), 377–385.
- Cianciotto, N.P., Fields, B.S., 1992. *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (11), 5188–5191.
- Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F., Greub, G., 2010. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213 (3), 158–166.
- Corsaro, D., Venditti, D., 2009. Detection of *Chlamydiae* from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. *Research Microbiology* 160 (8), 547–552.
- Covert, T.C., Rodgers, M.R., Reyes, A.L., Stelma Jr., G.N., 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6), 2492–2496.
- Craun, G.F., Calderon, R.L., Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *International Journal of Environmental Health Research* 15 (4), 243–262.
- da Silva Rocha, A., da Costa Leite, C., Torres, H.M., de Miranda, A.B., Pires Lopes, M.Q., Degraive, W.M., Suffys, P.N.,



1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *Journal of Microbiological Methods* 37 (3), 223–229.
- Dailoux, M., Laurain, C., Weber, M., Hartemann, P.H., 1999. Water and nontuberculous mycobacteria. *Water Research* 33 (10), 2219–2228.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., Ollevier, F., 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research* 41 (14), 3159–3167.
- Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition and Food Research* 50 (1), 7–17.
- Douesnard-Malo, F., Daigle, F., 2011. Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (21), 7640–7646.
- Fazil, M.H., Singh, D.V., 2011. *Vibrio cholerae* infection, novel drug targets and phage therapy. *Future Microbiology* 6, 1199–1208.
- Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms - a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59 (2), 151–163.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. *In situ* detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order rickettsiales. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1), 206–212.
- García, A., Goñi, P., Clavel, A., Lobez, S., Fernandez, M.T., Ormand, M.P., 2011. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology Reports* 3 (5), 622–626.
- Greub, G., La Scola, B., Raoult, D., 2004. Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture. *Emerging Infectious Disease* 10 (3), 470–477.
- Hannisch, W., Hallagan, L.F., 1997. Primary amebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. *Wilderness & Environmental Medicine* 8 (4), 211–213.
- Hong, Y.T., Soo, P.C., Shen, B.J., Hung, Y.L., Lo, K.Y., Su, H.P., Wei, J.R., Hsieh, S.C., Hsueh, P.R., Lai, H.C., 2006. Development of an improved PCR-ICT hybrid assay for direct detection of *Legionellae* and *Legionella pneumophila* from cooling tower water specimens. *Water Research* 40 (11), 2221–2229.
- Huhulescu, S., Simon, M., Lubnow, M., Kaase, M., Wewalka, G., Pietzka, A.T., Stoger, A., Ruppitsch, W., Allerberger, F., 2011. Fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a previously healthy woman was most likely associated with a contaminated hot tub. *Infection* 39 (3), 265–269.
- Iovieno, A., Ledee, D.R., Miller, D., Alfonso, E.C., 2010. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. *Ophthalmology* 117 (3), 445–452.
- Liu Xinyao, S.M., Yonghong, Liao, Yin, Gao, Zhongkai, Zhang, Donghui, Wen, Chencai, W.W. a. A., 2006. Feeding characteristics of an amoeba (Lobosea: Naegleria) grazing upon cyanobacteria: food selection. *Ingestion and Digestion Progress* 51, 315–325.
- Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M., Fromin, N., 2002. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S–23S rDNA spacer. *Systematic and Applied Microbiology* 25 (2), 220–227.
- Lutz, J.K., Lee, J., 2011. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (2), 554–564.
- Manage, Y.N.P.M., Nakano, Z. i. K. S.-i, 2004. Trophic coupling of a testate amoeba and *Microcystis* species in a hypertrophic pond. *Limnology* 5, 71–76.
- Matsiota-Bernard, P., Pitsouni, E., Legakis, N., Nauciel, C., 1994. Evaluation of commercial amplification kit for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (6), 1503–1505.
- Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., Yoshida, S., 1997. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7), 2489–2494.
- Nakasone, N., Iwanaga, M., 1998. Characterization of outer membrane protein OmpU of *Vibrio cholerae* O1. *Infection and Immunity* 66 (10), 4726–4728.
- Neilan, B.A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R.A., Schaub, V., Sivonen, K., Borner, T., 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 181 (13), 4089–4097.
- Nishibe, Y., Manage, P.M., Kawabata, Z., Nakano, S., 2004. Trophic coupling of a testate amoeba and *Microcystis* species in a hypertrophic pond. *Limnology* 5, 71–76.
- Pagnier, I., Merchat, M., Raoult, D., La Scola, B., 2009. Emerging *Mycobacteria* spp. in cooling towers. *Emerging Infectious Disease* 15 (1), 121–122.
- Phillip, M., von Reyn, C.F., 2001. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1363–1374.
- Rivera, I.N., Chun, J., Huq, A., Sack, R.B., Colwell, R.R., 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6), 2421–2429.
- Roch, N., Maurin, M., 2005. Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (6), 866–871.
- Rodriguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20 (3), 225–241.
- Sbidian, E., Kramkimel, N., Routier, E., Bularca, S., Duong, T.A., Roujeau, J.C., Legrand, P., Deforges, L., Bagot, M., 2010. Nosocomial disseminated *Mycobacterium chelonae* infection in an immunocompromised patient. *European Journal of Dermatology* 20 (3), 407.
- September, S.M., Els, F.A., Venter, S.N., Brozel, V.S., 2007. Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. *Journal of Water and Health* 5 (2), 219–227.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L., 2008. Iron availability affects *mcuD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology* 10 (10), 2476–2483.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Peleato, M.L., Fillat, M.F., 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the *mcuD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* 19 (7), 1167–1173.
- Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J., Stenstrom, T.A., 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 36 (9), 656–662.
- Thomas, J.M., Ashbolt, N.J., 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environmental Science and Technology* 45 (3), 860–869.
- Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G., 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology* 10 (10), 2728–2745.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Borner, T., Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemical Biology* 7 (10), 753–764.

- Van Wichelen, J., Van Gremberghe, I., Vanormelingen, P., Debeer, A.E., Leporcq, B., Menzel, D., Codd, G.A., Descy, J.P., Vyverman, W., 2010. Strong effects of amoebae grazing on the biomass and genetic structure of a *Microcystis* bloom (Cyanobacteria). *Environmental Microbiology* 12 (10), 2797–2813.
- Visvesvara, G.S., 2010. Amebic meningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases* 23 (6), 590–594.
- Wallace Jr., R.J., Silcox, V.A., Tsukamura, M., Brown, B.A., Kilburn, J.O., Butler, W.R., Onyi, G., 1993. Clinical significance, biochemical features, and susceptibility patterns of sporadic isolates of the *Mycobacterium chelonae*-like organism. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (12), 3231–3239.
- Yanez, M.A., Carrasco-Serrano, C., Barbera, V.M., Catalan, V., 2005. Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the *dotA* gene. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7), 3433–3441.
- Yanong, R.P., Poudel, D.B., Falkinham 3rd, J.O., 2010. Association of mycobacteria in recirculating aquaculture systems and mycobacterial disease in fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 22 (4), 219–223.
- Yuichiro, N., Pathmalal, M., Kawabata, Z., Shin-ichi, N., 2004. Trophic coupling of a testate amoeba and *Microcystis* species in a hypertrophic pond. *Japanese Society of Limnology* 5, 71–76.
- Zucks, P., 2011. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' Disease in Europe 2009. ECDC, Stockholm.

## CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Organizador del XVII Congreso SEIMC 2013, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

**CERTIFICA QUE:**

**M.T. Fernández, A. García, M.C. Alejandre, D. Lera, P. Gofii, M. Navarro, A. Clavel**

han realizado la presentación Poster de la comunicación con título:

**“Identificación de bacterias y protozoos en piscinas cubiertas y su potencial riesgo para la salud.”**

en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Zaragoza del 29 al 31 de mayo de 2013.

Y para que conste se expide el presente certificado en Zaragoza, a 31 de mayo de 2013.



**Dr. Francisco Javier Castillo García**  
**Presidente del Comité Organizador**



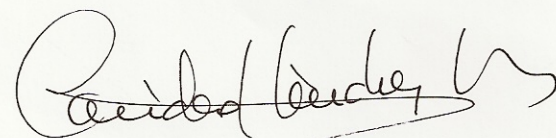
*Dña. Caridad Sánchez Acedo, Presidenta del Comité Organizador*

*Certifica que el trabajo titulado:*

**Aislamiento e identificación de amebas de vida libre en  
aguas de red y muestras clínicas de Aragón**

M. T. Fernández Rodrigo, Calvo Begueria, García Berna, Alejandro  
Agustín, M. F. Fillat Castejón, Peleato Sánchez, Navarro Elipe, P.  
Goñi Cepero, A. Clavel Parrilla

*Ha sido presentado en forma de **Póster** en el XII CONGRESO  
IBÉRICO DE PARASITOLOGÍA, que organiza la Sociedad  
Española de Parasitología.*



**Caridad Sánchez Acedo**  
Presidenta del Comité Organizador



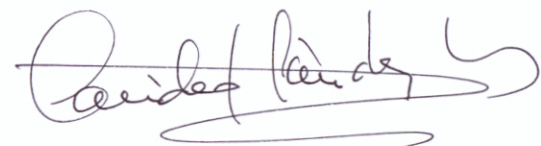
Dña. Caridad Sánchez Acedo, Presidenta del Comité Organizador

Certifica que el trabajo titulado:

**Amebas de vida libre (AVL) de los géneros  
*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* y  
microorganismos patógenos en pantanos de la  
Comunidad de Aragón**

A. García Berna, M. T. Fernández Rodrigo, L. Calvo Begueria,  
M. P. Goñi Cepero, M. F. Fillat

Ha sido presentado en forma de *Póster* en el XII CONGRESO  
IBERICO DE PARASITOLOGIA, que organiza la Sociedad  
Española de Parasitología.



Caridad Sánchez Acedo  
Presidenta del Comité Organizador