

# Trabajo Fin de Máster

---

## Determinación de amebas de vida libre en fuentes públicas de Tenerife

**Alumna: Leticia Fajardo Hernández**

**Tutor: Dr. Jacob Lorenzo Morales**

**Cotutora: Dra. María Reyes Batlle**

**Curso 2020-2021**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1 Amebas de Vida Libre.....	4
1.2 Ciclo de vida y morfología.....	4
1.3 Amebas de vida libre patógenas frecuentemente aisladas en muestras de agua .....	5
<b>2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS</b> .....	9
2.1 Objetivo General .....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
<b>3. MARCO METODOLÓGICO. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
3.1 Materiales utilizados .....	10
3.2 Recogida de muestras.....	11
3.3 Filtración de aguas para la detección de amebas de vida libre.....	11
3.4 Detección de amebas en placas de ANN.....	12
3.5 Extracción de ADN .....	12
3.6 Amplificación de ADN obtenido por PCR.....	13
3.7 Electroforesis en gel.....	13
3.8 Análisis de las secuencias obtenidas .....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	25
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	26

## RESUMEN

El interés por las amebas de vida libre (AVL) ha aumentado en los últimos años debido al incremento de estos protozoos en los diferentes ambientes que nos rodean: aguas potables y marinas, suelo, aire, polvo entre otros, así como el aumento en el diagnóstico de las diversas enfermedades que estas producen. Estos protozoos cuentan con dos fases en su ciclo de vida: el trofozoíto o fase vegetativa, y el quiste o fase extremadamente resistente a factores fisicoquímicos, como los desinfectantes habituales. Dentro de las AVL podemos destacar al género *Acanthamoeba*, como el grupo de AVL mayoritariamente aislado tanto en muestras clínicas como ambientales. El objetivo del presente trabajo es detectar la presencia de AVL en las muestras de aguas recogidas en las diferentes fuentes públicas de la isla de Tenerife con el fin de evaluar el posible riesgo sanitario que podrían presentar.

Nuestros resultados han determinado que un 32,26% de las muestras analizadas fueron positivas para la presencia de AVL. Con ayuda de herramientas moleculares hemos determinado que, de este porcentaje de positivos el 50% corresponde a especies del género *Acanthamoeba* y 50% a otras especies relevantes de AVL, como *Naegleria americana* o *Vermamoeba vermiformis*. Como complemento de nuestro trabajo de laboratorio, hemos procedido a ponernos en contacto con los ayuntamientos de los términos municipales a los que pertenecían las aguas positivas, recibiendo por escrito por parte de los responsables que sus aguas se encontraban tratadas y aptas para el consumo humano. Por lo tanto, con el presente trabajo demostramos que los procesos establecidos en el tratamiento de estas aguas para consumo humano no son efectivos frente a las AVL.

## ABSTRACT

Interest in free-living amoebas (FLA) have raised in recent years due to the increase of these protozoa in the different environments that surround us: drinking and marine waters, soil, air, dust among others, as well as the increase in the diagnosis of the various diseases that this produce. These protozoa have two phases in their life cycle: the trophozoite or vegetative phase, and the cyst or phase extremely resistant to physicochemical factors, such as the usual disinfectants. Within the FLA we can highlight the genus *Acanthamoeba*, as the group of FLA mostly isolated in both clinical and environmental samples. The objective of this work is to detect the

presence of FLA in the water samples collected from different public fountains on the island of Tenerife to assess the possible health risk that they could present.

Our results have determined that 32,26% of the samples analyzed were positive for the presence of FLA. With the help of molecular tools, we have determined that 50% of this percentage of positives correspond to species of the genus *Acanthamoeba* and 50% to other relevant FLA species such as *Naegleria fowleri* or *Vermamoeba vermiformis*. As a complement to our laboratory work, we have proceeded to contact the councils of the municipalities to which the positive waters belonged, receiving in writing from those responsible that their waters were treated and suitable for human consumption are not effective against FLA.

**Palabras clave:** Ameba, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria*, *Vermamoeba vermiformis*, trofozoíto, quiste, fuentes públicas

**Glosario:** AVL o FLA: amebas de vida libre; EGA: Encefalitis Granulomatosa Amebiana; QA: queratitis amebiana; MAP: Meningoencefalitis Amebiana Primaria, SNC: sistema nervioso central, ANN: Agar no nutritivo, rpm: revoluciones por minuto, PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la Polimerasa)

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Amebas de Vida Libre

En los últimos años, se ha incrementado el interés por las amebas de vida libre (AVL) debido al aumento de infecciones producidas por estos microorganismos, no solo en países que se encuentran en vías de desarrollo sino también en países desarrollados. Las AVL se encuentran ampliamente distribuidas alrededor del mundo: agua, aire, suelo, polvo entre otros (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Mahmoudi *et al.*, 2012). Además, se pueden encontrar también en lugares más específicos como lentes de contacto, agua potable, piscinas, etc. (Scheikl *et al.*, 2014)

Las AVL son protozoos, eucariotas y aerobios. Reciben también el nombre de amebas anfizoicas debido a que son capaces de vivir en la naturaleza de manera libre pero también pueden vivir como parásitos si invaden un tejido huésped animal (Gertiser *et al.*, 2015). Han sido caracterizadas produciendo infecciones tanto en seres humanos como otros animales tales como: en ojos, pulmones, piel e incluso en el cerebro, de tal manera que pueden llegar a causar queratitis, amebiosis cutánea, encefalitis mortales como la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP), o la Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) (Gertiser *et al.*, 2015).

## 1.2 Ciclo de vida y morfología

Las AVL tienen un ciclo de vida compuesto por dos estadios: el trofozoíto y el quiste, a excepción de especies del género *Naegleria* que presenta un tercer estadio flagelado (Page, 1988). Se denomina trofozoíto a su forma vegetativa, la que se alimenta, reproduce y se mueve con pseudópodos (Shyam *et al.*, 2020). Los pseudópodos son unas prolongaciones del citoplasma que ayudan a las amebas a desplazarse y alimentarse, reciben también el nombre de “pies falsos” (Heidegger, 1995). Por otro lado, se encuentran los quistes, que están compuestos por dos paredes formadas por celulosa y proteínas (endoquiste y exoquiste), las cuales se fusionan en estructuras similares a los poros, por los que el trofozoíto sale en el proceso de desenquistamiento (Alves *et al.*,

2012). El estadio quístico es muy resistente a las condiciones ambientales adversas (Schuster *et al.*, 2004).

### 1.3 Amebas de vida libre patógenas frecuentemente aisladas en muestras de agua

#### 1.3.1 *Acanthamoeba* spp.

Las especies del género *Acanthamoeba* poseen pseudópodos afilados como espinas, denominados acantópodos, que generan un movimiento lento. Sus quistes tienen un núcleo con cariosoma central y su morfología es poliédrica pudiendo parecer estrellada con una doble pared bien diferenciada (Sandí *et al.*, 2014). Es el género aislado de manera más frecuente, tanto en muestras clínicas como ambientales, y son capaces de ocasionar patologías en humanos y otros animales, asociadas al SNC y otros tejidos (Rodríguez y Morales, 2019). Podemos destacar especies como *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. divionensis*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. lugdunensis*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. quina* y *A. rhyodes* (Macklellan, 2002).

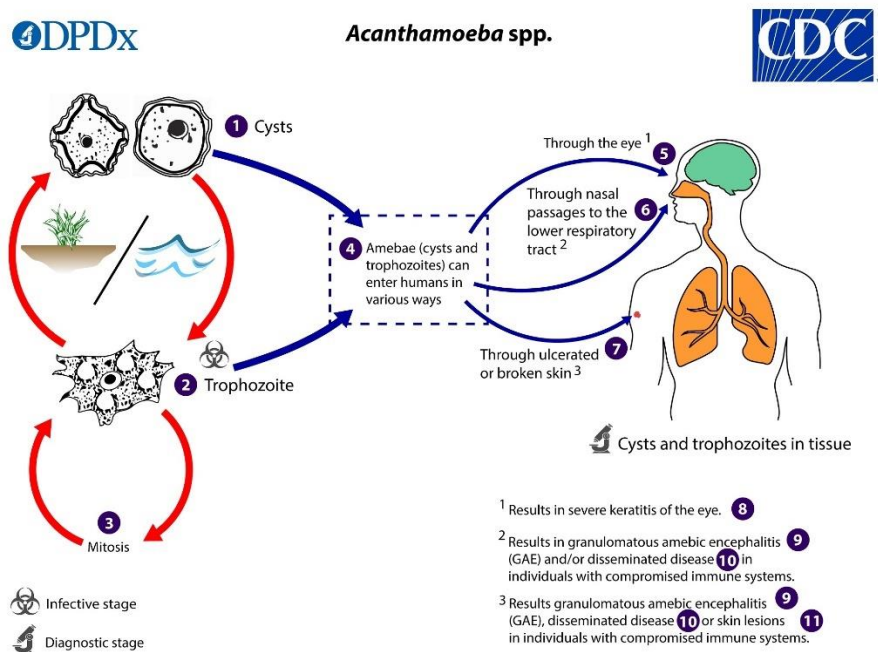


Figura 1: Ciclo de vida de *Acanthamoeba* y vía de entrada en humanos. *Center of Disease and Control* (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>)

Son capaces de infectar de manera oportunista y no oportunista. De tal manera que afecta a pacientes inmunodeprimidos produciéndoles Encefalitis Granulomatosa

Amebiana (EGA) e infecciones cutáneas (Claire *et al.*, 2015 y Sandí *et al.*, 2014). Y como no oportunista afectando a personas sanas como los usuarios de lentes de contacto con una higiene deficiente, produciendo la queratitis amebiana (QA) (Maffrand *et al.*, 2019 y Abente *et al.*, 2019).

### 1.3.2 *Naegleria fowleri*

Como ya hemos comentado anteriormente, *N. fowleri* presenta además un tercer estadio flagelado, lo que le permite una mayor eficacia a la hora de desplazarse en medio acuoso (De Jonckheere, 2014). También posee un solo núcleo con cariosoma central y, como el resto de los miembros de la Familia Vahlkampfiidae, su desplazamiento se basa en la emisión de un pseudópodo dominante (Balczun y Scheid, 2017).

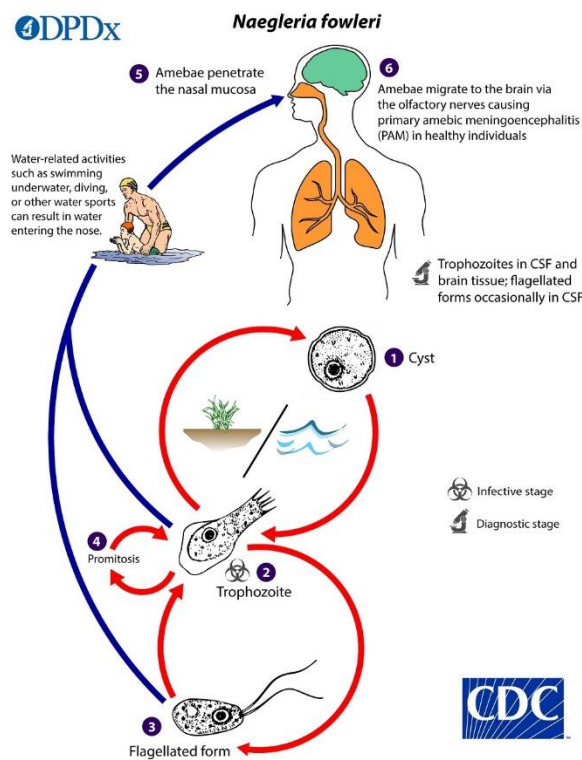


Figura 2: Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* y vía de entrada en humanos. Center of Disease and Control (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>)

A pesar de que existen varias especies dentro del género *Naegleria*, solo *N. fowleri* ha sido detectada produciendo patología, concretamente Meningoencefalitis Amebiana Primaria o MAP en humanos. Estos casos han sido diagnosticados en personas inmunocompetentes, sobre todo niños y adultos jóvenes, cuyos antecedentes son actividades acuáticas en agua dulce (De Jonckheere, 2014). La MAP es una enfermedad

del SNC, rara pero aguda, fulminante, de rápido desarrollo y con una mortalidad superior al 95% (Siddiqui R, 2016). Además, se ha demostrado la gran importancia de las altas temperaturas para el desarrollo de esta especie siendo detectada muy frecuentemente en aguas termales (Fierro *et al.*, 2019).

### 1.3.3 *Vermamoeba vermiformis*

Inicialmente esta especie se encontraba dentro del género *Hartmannella*, el cual comparte orden con los géneros *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, pero en 2011 Smirnov y colaboradores crearon el género *Vermamoeba*, especie *vermiformis* y de la familia Vermamoebidae. La importancia a nivel clínico de esta especie es que es termotolerante, lo cual es uno de los factores que se deben tener en cuenta para calificar a una ameba como potencialmente patógena. Tras el reporte de un caso de encefalitis fulminante reportada por Centeno y colaboradores (1996), varios casos de queratitis (Aitken *et al.*, 1996; De Jonckheere y Brown, 1998; Abedkhozasteh *et al.*, 2013) y otro de una úlcera en el epitelio facial reportado por Scheid y colaboradores (2019), se ha llegado a la conclusión de que la *V. vermiformis* puede ser considerada como un parásito potencial para los seres humanos.

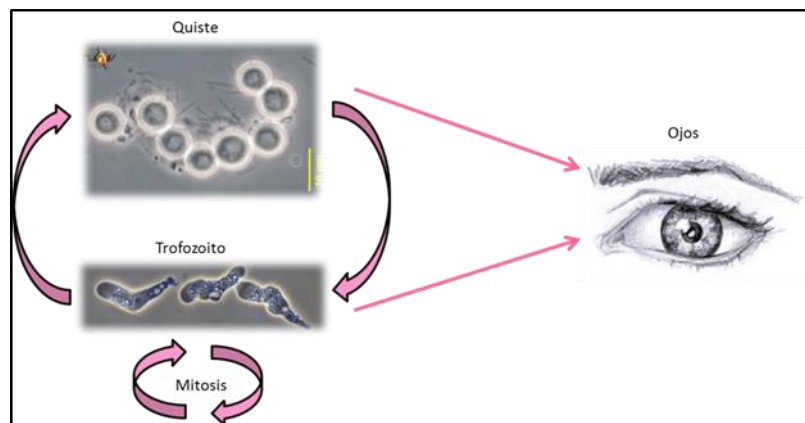


Figura 3: Representación del ciclo y vía de entrada más común de *V. vermiformis*. Elaboración de la tesis doctoral de Reyes-Batlle (2016)



Es relevante destacar que, hasta el día de hoy, no se ha podido establecer un tratamiento para las infecciones producidas por AVL, ya que su efectividad depende de los pacientes y de la rapidez del diagnóstico, o generan graves efectos secundarios (Qvarnstrom *et al.*, 2009). Por último, es importante mencionar que la legislación existente en el mundo en general para aguas de abasto se refiere únicamente a la determinación de bacterias fecales (Directiva 98/83/CE). Solo en países como México y Australia sí existe legislación sobre la presencia de AVL en agua. Siendo más específicos, en España solo se encuentra legislación aplicable a parásitos en aguas de abasto para la detección de *Cryptosporidium* (RD 140/2003) (Magnet *et al.*, 2013). Por lo tanto, sabiendo que no existen protocolos de detección ni de eliminación en agua establecidos, consideramos de gran importancia estudiar su presencia en las aguas de estrecho contacto humano, como son las aguas de consumo o de recreo.

## **2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### 2.1 Objetivo General

El Objetivo General de este estudio es detectar la presencia de AVL en muestras de aguas recogidos en fuentes públicas de la isla de Tenerife, con el fin de evaluar el posible riesgo para la población.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Aislamiento de amebas de vida libre en las muestras de aguas procedentes de fuentes públicas de la isla de Tenerife mediante la técnica de cultivo en agar no nutritivo.
- Caracterizar molecularmente las amebas de vida libre aisladas, mediante PCR y secuenciación.

### 3. MARCO METODOLÓGICO. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales utilizados

Medios de cultivo
Agar no nutritivo (ANN), VWR

Tabla 1: Medios de cultivo

Reactivos
PAS ( <i>Page's Amoeba Saline Solution</i> )
Taq Polymerase Kit, VWR
dNTP mix, VWR
TAE 1%
Tampón de carga 6X, VWR
Gel Red®
Marcador de peso molecular de ADN, ThermoScientific
Cebadores específicos
- FLAf / FLAr (Universales de AVL)
- JDP1 / JDP2 (específicos <i>Acanthamoeba</i> spp.)
- Vahl1 / Vahl2 (específicos Fam. Vahlkampfiidae)
Agarosa, VWR
Agua destilada

Tabla 2: Reactivos

Equipamiento
Garrafas de agua de 5 u 8 litros
Filtros de nitrocelulosa de 0.45µm
Pinzas
Mechero de alcohol
Alcohol 96°
Soplete
Embudos estériles
Papel Parafilm®
Pipetas Pasteur de vidrio
Gradilla
Tubos Eppendorf® 1,5mL
Pipetas automáticas
Kit para la extracción de ADN Maxwell® 16
Termociclador Artik™ (ThermoScientific)
Microondas Bluesky
Botellas de vidrio
Balanza Sartorius™
Moldes para geles de agarosa
Cubeta horizontal de electroforesis BioRad®

Fuente de electricidad BioRad®
Transiluminador para captura de imágenes BioRad®
Microscopio invertido Leica Dmil
Microscopio invertido EVOS FL (ThermoFisher)

Tabla 3: Equipamiento

<b>Software, aplicaciones y páginas web</b>
Fuentes públicas: <a href="https://drinkingwater.directory/es">https://drinkingwater.directory/es</a>
Software <i>ImageLab</i> para revelado de electroforesis
Aplicación <i>ChromasPro</i> para el análisis de las secuencias de ADN
Base de datos del NCBI: <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov)</a>
Xiaomi Redmi Note 7
iPhone X
iPhone 11 Pro Max

Tabla 4: Software, aplicaciones y páginas web

### 3.2 Recogida de muestras

- 1° Con la ayuda de la página web “<https://drinkingwater.directory/es>” se ha dividido la isla de Tenerife en 8 partes, de tal manera que, cada día se ha ido en busca de la recogida de muestras a una parte de Tenerife
- 2° Con la aplicación *Google Maps* se ha procedido a ir a los puntos que nos marcan en la página web de las Fuentes de Agua Potable en Tenerife
- 3° Tras encontrar una de las fuentes públicas, se apunta la dirección y se le asigna un código a la muestra
- 4° Se debe recoger un mínimo de 3 litros de cada agua y se mantendrá entre 2-4°C hasta que se lleve a cabo su procesado en el laboratorio

### 3.3 Filtración de aguas para la detección de amebas de vida libre

- 1° Las muestras serán filtradas a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45µm de diámetro de poro manteniendo en todo momento la esterilidad gracias a un mechero de alcohol
- 2° Una vez hayamos filtrado toda el agua, los filtros se deben sembrar boca abajo en las placas de ANN para que las posibles amebas estén en contacto directo con el medio
- 3° Para finalizar, se proceden a sellar las placas con Parafilm® y se incuban a temperatura ambiente

### 3.4 Detección de amebas en placas de ANN

1º Pasados entre 3 y 5 días, se levantan los filtros de las placas de ANN y se observan diariamente al microscopio para detectar la presencia de amebas

2º En caso de observarse amebas, se procede a su aislamiento mediante la técnica de clonaje o replicado. Se harán tantas réplicas como sea necesario con el objetivo de obtener un solo tipo morfológico de amebas en una placa de ANN y sin contaminación por otros microorganismos. Este proceso consiste en recortar la zona de agar donde se observa crecimiento de amebas y se coloca el trozo boca abajo en una nueva placa de ANN

3º Cuando obtengamos un solo tipo morfológico de amebas se extrae el ADN para comenzar con su caracterización molecular

### 3.5 Extracción de ADN

1º Se pueden realizar dos tipos de extracción de ADN: recortando el trozo o por raspado. En ambos es importante mantener la esterilidad haciendo uso del mechero de alcohol.

Para el raspado:

- Las placas se lavarán con solución salina de Page (*Page's Amoeba Solution* o PAS) y se rasparán con un cayado de vidrio. Recogemos toda la solución para su centrifugación (10 minutos a 2000 rpm) y el pellet obtenido se inoculará directamente en el primer pocillo del cartucho del sistema automatizado de extracción de ADN Maxwell® 16 Mouse Tail DNA

En el caso de la extracción de ADN recortando el trozo:

- Se recorta la superficie del agar donde se encuentra el crecimiento concentrado de amebas y se introduce en el primer pocillo del cartucho Maxwell® 16 Mouse Tail DNA

2º A continuación, se utiliza el aparato de Maxwell® siguiendo las instrucciones del fabricante para conseguir el ADN de las muestras

### 3.6 Amplificación de ADN obtenido por PCR

1° En función del tipo morfológico de ameba observado en las placas de ANN se usará una determinada pareja de cebadores, siempre añadiendo un control positivo y un control negativo. Se inoculan las muestras de ADN a la concentración deseada en los eppendorf de 0.2mL, así como ambos controles

2° La reacción de PCR contará con 40-100 ng/ $\mu$ L de ADN, buffer 10x, dNTPs, pareja de cebadores (Tabla 5), Taq polimerasa y agua

Pareja de cebadores	Secuencia
Universales de AVL (Tsvetkova <i>et al.</i> , 2004) 2 minutos a 95°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.	FLAf: 5' – CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC – 3'
	FLAr: 3' – CAGGTAAAGGTCTCGTTCGTTAAC – 5'
<i>Acanthamoeb</i> spp. (Schroeder <i>et al.</i> , 2001) 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.	JDP1: 5' - GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA - 3'
	JDP2: 3' - TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA – 5'
Fam. Vahlkampfiidae (De Jonckheere and Brown, 2005) 2 minutos a 95°C; 35 ciclos de 60 segundos a 95°C, 90 segundos a 55°C y 120 segundos a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.	Vah11: 5' - GTCTTCGTAGGTGAACCTGC- 3'
	Vah12: 3' - CCGCTTACTGATATGCTTAA- 5'

Tabla 5: Secuencias de las AVL según la pareja de cebadores

3° Una vez concluido el programa elegido, se guardan las muestras en el congelador hasta que se realice la electroforesis en gel de agarosa

### 3.7 Electroforesis en gel

1° Se hará un gel de 30 mL de TAE al 2% de agarosa haciendo uso de un agente intercalante como es el Gel red® para la visualización del ADN bajo una lámpara de luz UV

2° Se agregan 2 $\mu$ L de muestra junto con el tampón de carga y se inoculan en uno de los pocillos del gel

3° Se enciende la fuente dejándola actuar 20 minutos a 80V

4º Una vez terminado, se lleva el gel al transiluminador ChemiDoc de Biorad®. Si las muestras han amplificado serán enviadas para su secuenciación en el servicio externo Macrogen Spain (Madrid)

### 3.8 Análisis de las secuencias obtenidas

1º Cuando la empresa Macrogen Spain recibe las muestras llevan a cabo la secuenciación y nos las envían en formato FASTA

2º Para poder comparar este formato FASTA con la base de datos, se necesita la aplicación *ChromasPro*.

3º Se copia este formato FASTA desde esta aplicación y, en la base de datos del NCBI, se abre la casilla de “Nucleotide BLAST” para poder llevar a cabo la caracterización de las muestras

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 31 muestras analizadas en el presente estudio, el 32,26% (10/31) fueron positivas para el crecimiento de AVL en agar no nutritivo. De estas positivas, en el tiempo que ha durado la parte experimental de este TFM, hemos podido caracterizar molecularmente el 50% (5/10) de ellas (ejemplo en Figura 4). El resto siguen en proceso de aislamiento ya que presentan crecimiento de otros microorganismos, pero tenemos evidencias morfológicas de que pertenecen al grupo de las AVL (fotos adjuntas). De las 5 muestras caracterizadas, 3 de ellas (60%) son del género *Acanthamoeba* y el otro 40% (2/5) pertenecen a *Naegleria* y *Vermamoeba*. Es importante destacar, que la gran mayoría de las muestras recogidas pertenecen a la zona norte de la isla, donde este tipo de fuentes se utilizan con bastante más frecuencia que en otras zonas debido a las costumbres populares.

CÓDIGO	LOCALIZACIÓN	ANN	PCR	ESPECIE
AF1	Los Batanes (San Cristóbal de La Laguna)	-	-	n/a
AF2	Valle Jiménez (Santa Cruz de Tenerife)	-	-	n/a
AF3	Camino de Las Peras (San Cristóbal de La Laguna)	-	-	n/a
AF4	Área Recreativa de Pedro Álvarez (Tegeste)	+	+	<i>Naegleria americana</i>
AF5	Área Recreativa Llano Los Viejos (Las Mercedes)	+	+	<i>Acanthamoeba castellanii</i> T4
AF6	Finca Zamora (Tegeste)	-	-	n/a
AF7	Plaza El Sauzal	+	-	AVL
AF8	Los Lavaderos (El Sauzal)	+	-	AVL
AF9	Área de ejercicio (El Sauzal)	-	-	n/a
AF10	Centro cívico Las Baboseras (Ravelo)	-	-	n/a
AF11	Las Calderetas (Ravelo)	-	-	n/a
AF12	Camino Chasna (La Orotava)	-	-	n/a
AF13	Parque García Sanabria (Santa Cruz de Tenerife)	-	-	n/a
AF14	Playa de Las Teresitas (Santa Cruz de Tenerife)	-	-	n/a
AF15	C/Real, 168 (La Matanza de Acentejo)	+	-	AVL
AF16	Parque El Montillo (La Matanza de Acentejo)	+	+	<i>Acanthamoeba</i> spp., T4
AF17	Mirador Las Breñas	-	-	n/a



	(El Sauzal)			
<b>AF18</b>	Carretera Gral, 24 (La Matanza de Acentejo)	-	-	n/a
<b>AF19</b>	Carretera Gral, Km27 (La Victoria de Acentejo)	-	-	n/a
<b>AF20</b>	Parque El Pinar (La Victoria de Acentejo)	-	-	n/a
<b>AF21</b>	Camino Los Dornajos (La Victoria de Acentejo)	-	-	n/a
<b>AF22</b>	Calle Potigaiga (La Victoria de Acentejo)	-	-	n/a
<b>AF23</b>	Calle Potigaiga, 45-49 (La Victoria de Acentejo)	-	-	n/a
<b>AF24</b>	Calle Rosario Pérez Correa, 1 (Santa Úrsula)	+	+	<i>Vermamoeba vermiformis</i>
<b>AF25</b>	Plaza de la Luz (Los Silos)	+	+	<i>Acanthamoeba palestinensis</i> T2
<b>AF26</b>	Calle de Felix Benitez de Lugo, 26 (Los Silos)	-	-	n/a
<b>AF27</b>	Minigolf Santiago (Los Cristianos)	-	-	n/a
<b>AF28</b>	Calle La Ramira, 4 (Buenavista del Norte)	-	-	n/a
<b>AF29</b>	Camino de la Fuente de La Vega, 95-99 (Icod de Los Vinos)	+	-	AVL
<b>AF30</b>	C/Vera de Salamanca (Güímar)	+	+	AVL
<b>AF31</b>	Placeta Pedro Melián Díaz, 9-11 (Tegueste)	-	-	n/a

Tabla 6: muestras de aguas donde se recoge un total de 31 muestras de aguas de diferentes fuentes públicas en toda la isla de Tenerife. ANN: Agar no nutritivo; n/a: no aplica

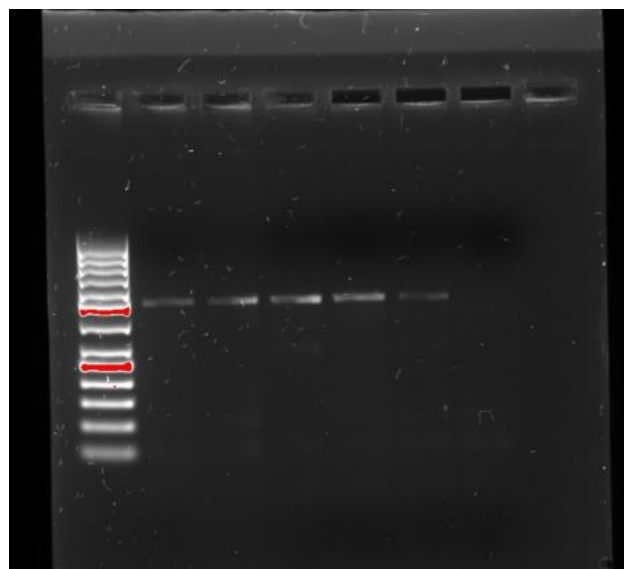


Figura 4: Electroforesis de una PCR donde se aprecian las bandas de ADN amplificado con los cebadores específicos de *Acanthamoeba* spp. de las muestras AF5, AF16, AF25, dos controles positivos de *Acanthamoeba* spp. y un control negativo en el Transiluminador Biorad®. Software: ImageLab.

Entre los diferentes positivos obtenidos se han identificado *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria americana* y *Vermamoeba vermiformis*. Estos datos confirman los resultados obtenidos por otros investigadores que analizaron la presencia de AVL en aguas, donde estos grupos también fueron los más abundantes (Reyes-Batlle *et al.*, 2019). Debido a sus características fisicoquímicas, el medio acuático es el ambiente donde más se ha estudiado la presencia de AVL habiendo sido detectadas e identificadas en diferentes tipos de aguas, entre las que destacan las aguas potables (Thomas *et al.*, 2008; Delafont *et al.*, 2013; Magnet *et al.*, 2013). Las especies de *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria americana* y *Vermamoeba vermiformis* se han aislado tanto en muestras de agua potable como en aguas termales naturales, piscinas, redes de agua hospitalarias entre otras (Visvesvara *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008, Bonilla-Lemus *et al.*, 2010).

*Acanthamoeba spp.* es un patógeno oportunista y su hábitat natural es el medio ambiente. A pesar de ello, si encuentra un huésped puede infectarlo y producirle una enfermedad (Khan, 2009). Las vías de entrada descritas hasta el momento son los ojos, en cuyo caso se produciría una queratitis amebiana, o las fosas nasales o piel dañada (Khan, 2009), de manera que se produce una Encefalitis Granulomatosa Amebiana o EGA (Figura 1). Dentro del género *Acanthamoeba*, gracias a la secuencia de nucleótidos de un fragmento del gen 18s del ARNr conocida como DF3, encontramos 22 genotipos descritos hasta el momento (T1-T22) (Tice *et al.*, 2016; Haniloo *et al.*, 2017).

Dentro de ellos, el T4 es aquel al que pertenecen el mayor número de cepas aisladas de infecciones y de muestras ambientales (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Geisen *et al.*, 2016). Las muestras AF5 (*A. castellanii*) y AF16 (*Acanthamoeba spp.*) pertenecen al genotipo T4 mientras que AF25 (*A. palestinensis*) pertenece al T2. Este último es un genotipo aislado mayoritariamente en muestras ambientales, pero también ha sido diagnosticado como agente causal de QA (Mahsood *et al.*, 2005; Kao *et al.*, 2012). En la Figura 5, correspondiente a la muestra AF16 podemos observar la morfología estrellada típica de los quistes de *Acanthamoeba spp.*

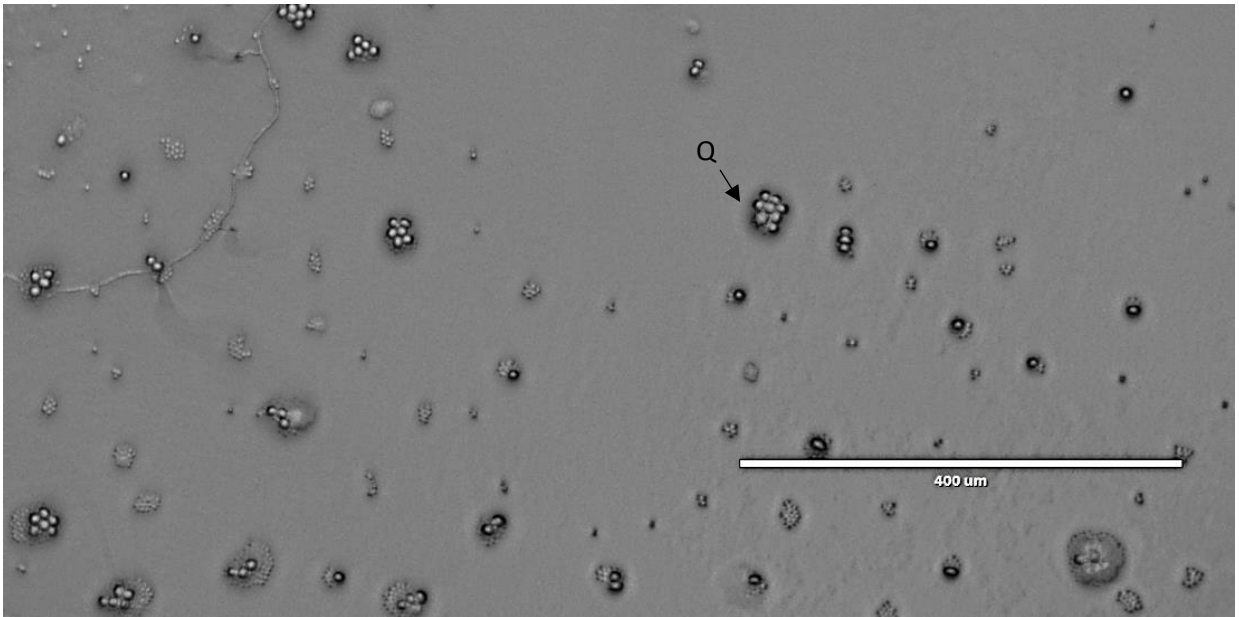


Figura 5: Fotografía de la muestra AF16 *Acanthamoeba* spp. Thermo Fisher EVOS, objetivo 10x. Q: indica quistes

El resultado de secuenciación de la muestra AF4 determina que pertenece a la especie *Naegleria americana*. En la Figura 6 podemos ver tanto trofozoítos (T) como quistes (Q).

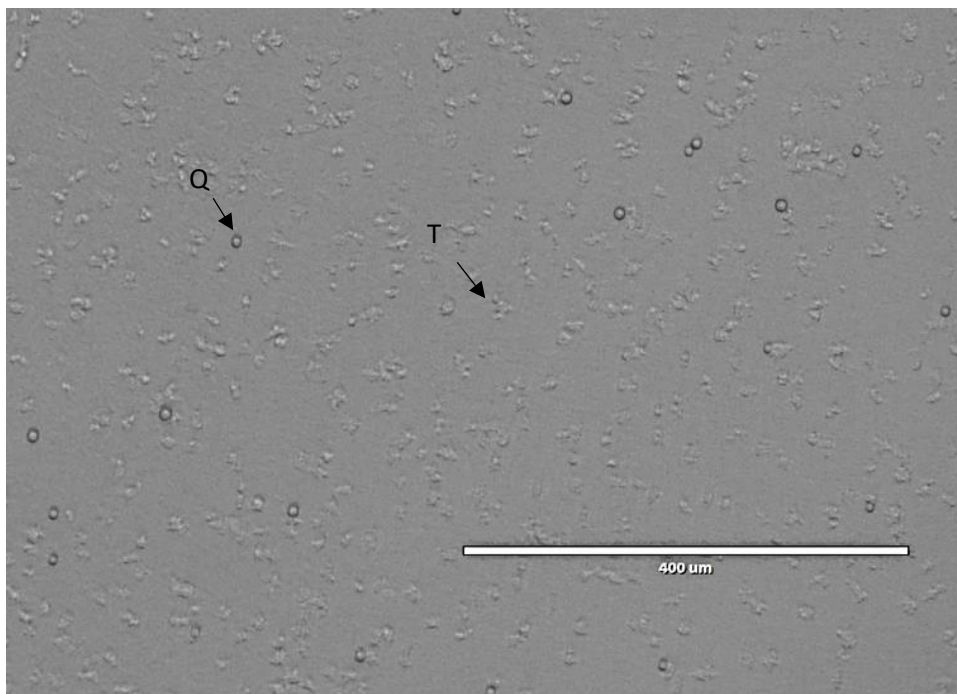


Figura 6: Fotografía de la muestra AF4 *N. americana* donde se aprecian los trofozoítos y quistes. Thermo Fisher EVOS, objetivo 10x

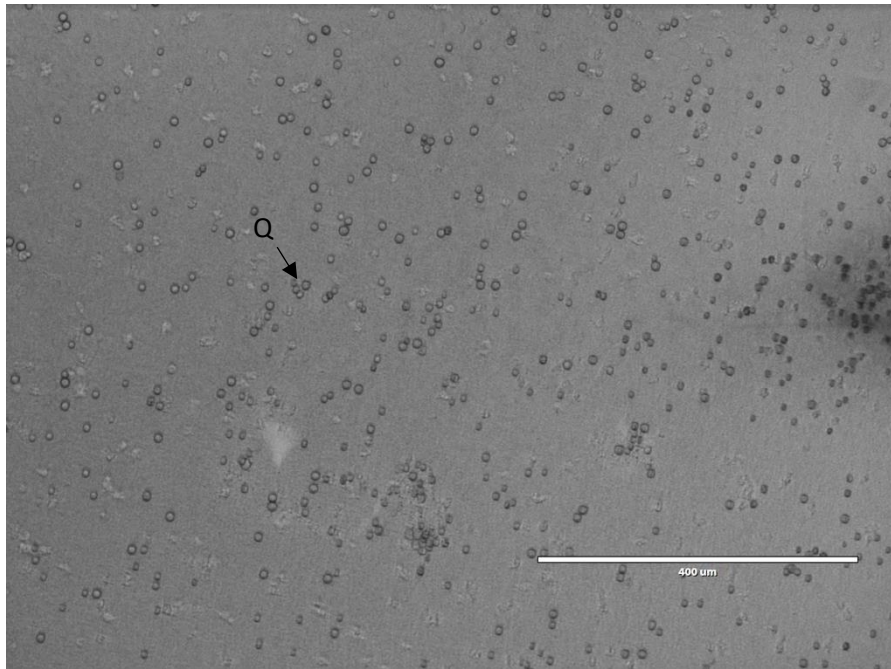


Figura 7: Fotografía de la muestra AF4 *N. americana* donde se aprecia una gran cantidad de quistes. Thermo Fisher EVOS, objetivo 10x

Dentro del género *Naegleria*, solo *N. fowleri* es patógena en humanos, siendo el agente causal de la MAP (Schuster y Visvesvara, 2004). La vía de entrada es por las mucosas nasales, donde son capaces de migrar al cerebro por los nervios olfativos y afectar al SNC (Trabelsi *et al.*, 2012; Imagen 3). *N. australiensis*, *N. philippinensis* y *N. italica* también han sido reportadas como causante de MAP en animales de experimentación (Siddiqui *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de haber sido detectada en multitud de ambientes, sobre todo acuáticos (Pazoki *et al.*, 2020), *N. americana* no ha sido descrita como causante de ninguna patología. Lo destacable de nuestro hallazgo es que los requerimientos nutricionales y fisiológicos de *N. americana* y el resto de las especies del género mencionadas, son muy similares (Siddiqui *et al.*, 2016), pudiendo por tanto ser un nicho habitable por las especies patógenas del género.

Por otro lado, la muestra AF24 ha sido positiva para *Vermamoeba vermiformis* mediante la amplificación por PCR. La especie *V. vermiformis* destaca por su alta termotolerancia, lo cual es un factor determinante a la hora de calificar a una ameba como potencialmente patógena, ya que se puede adaptar a las condiciones fisiológicas de un organismo superior (Reyes-Batlle *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2021).

Por último, a pesar de no haber terminado con el proceso de genotipado de las muestras AF7, AF8, AF15, AF29 y AF30, podemos apreciar en las siguientes imágenes la morfología típica de trofozoítos y quistes de AVL.

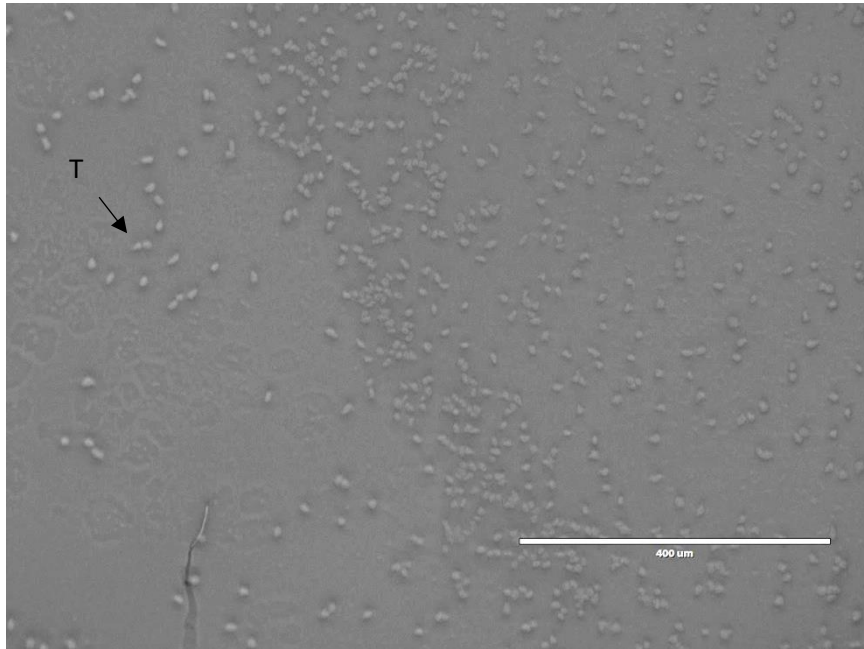


Figura 8: Fotografía de la muestra AF7 donde se aprecian trofozoítos de AVL. Thermo Fisher EVOS, objetivo 10x

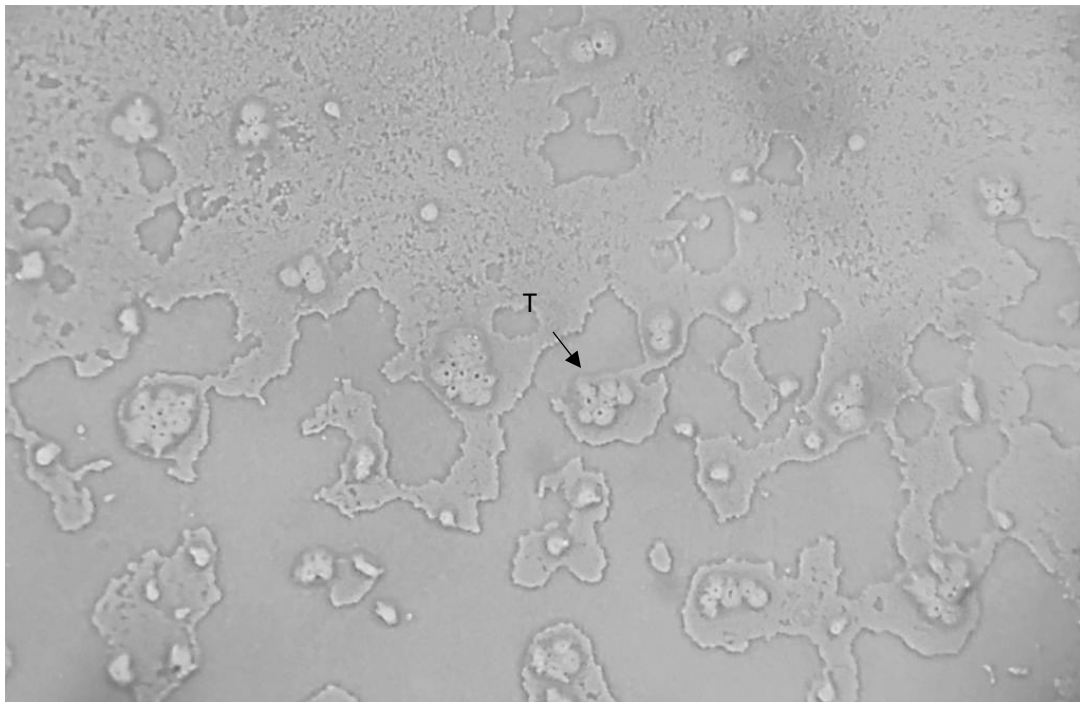


Figura 9: Fotografía de la muestra AF8 donde se aprecia la morfología típica de trofozoítos de AVL, con sus vacuolas contráctiles bien destacadas. Microscopio Leica Dmil, objetivo 20x. Capturada con el iPhone X



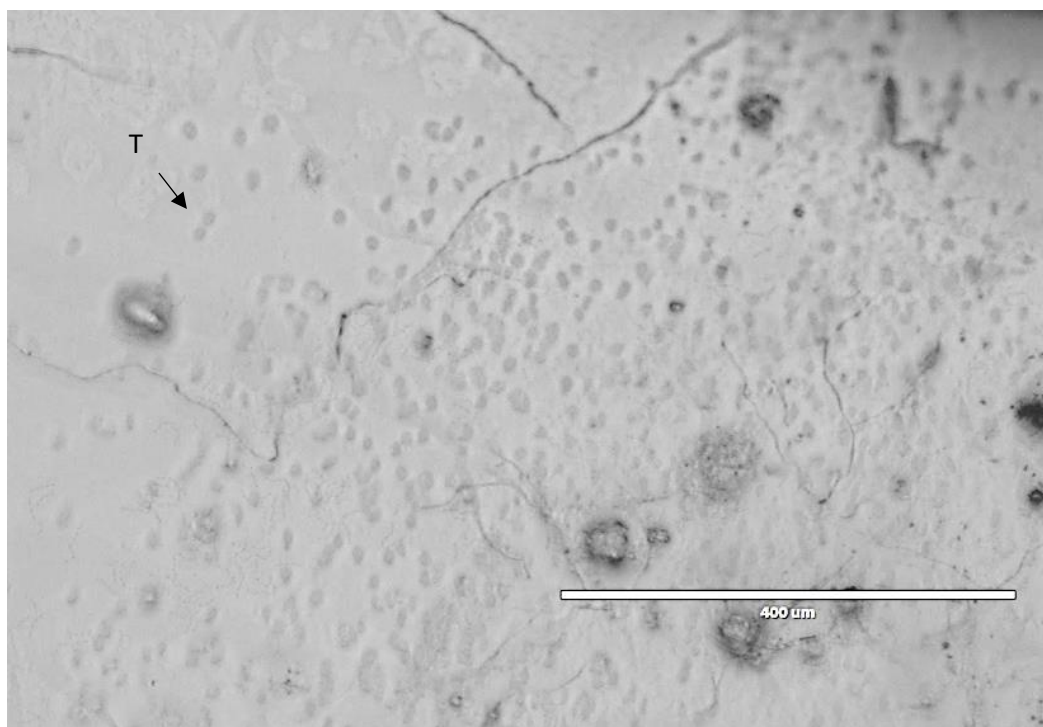


Figura 10: Fotografía de la muestra AF15 donde se aprecian trofozoítos de AVL acompañados de hifas de hongos, que hacen más largo su aislamiento. Thermo Fisher EVOS, objetivo 10x

En las figuras de las muestras AF7, AF8 y AF15 morfológicamente es muy difícil poder determinar a qué grupo de AVL pertenecen los quistes y trofozoítos visualizados. Sin embargo, las muestras AF29 y AF30 se han podido caracterizar morfológicamente.

En la AF29, se puede apreciar la morfología típica de trofozoítos y quistes de la especie de *V. vermiformis*, la cual pudimos dejar clara en la Figura 3. Los quistes son redondeados, con una doble pared engrosada y los trofozoítos presentan una morfología alargada.

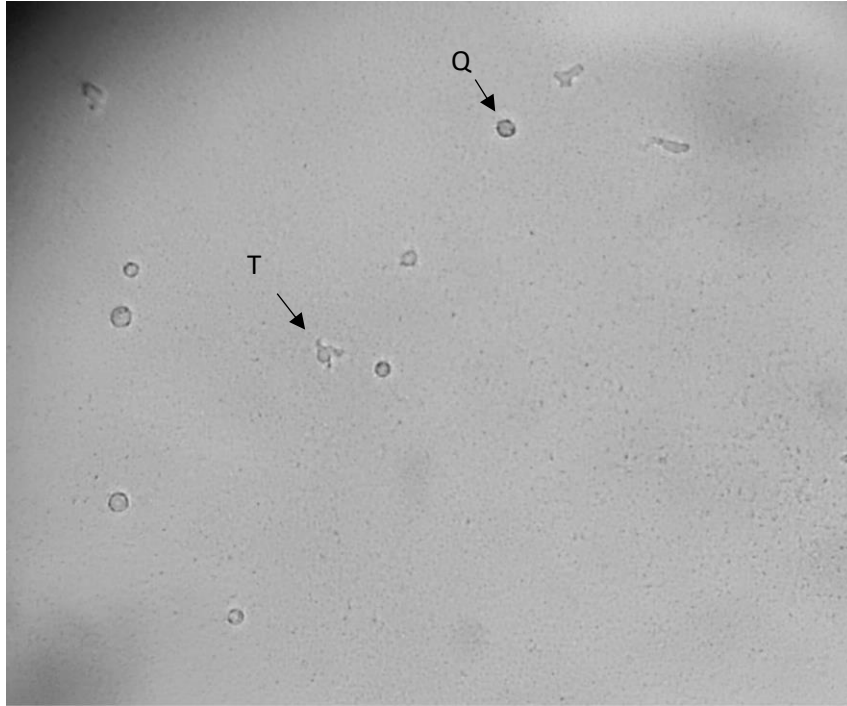


Figura 11: Fotografía de la muestra AF29 posible *Vermamoeba* donde se aprecian los quistes y trofozoítos. Microscopio Leica Dmil, objetivo 20x. Capturada con el Xiaomi Redmi Note 7

En el caso de la AF30 se observa la morfología típica de *Cercozoa* spp. perteneciente al filo Cercozoa. Se trata de un grupo de AVL muy común en suelos de clima templado, ubicuos y de gran diversidad morfológica, que se han incluido recientemente en el supergrupo Rhizaria. Son amebas testáceas que no cuentan con fase quística (Irwin *et al.*, 2019; Harder *et al.*, 2016). Algunas especies de este grupo pueden ocasionar patogenia en plantas, como la enfermedad de la caña de azúcar producida por *Phytocercomonas venatans* (Braithwaite *et al.*, 2018). En la Figura 12, publicada por Dumack y colaboradores (2016), podemos ver la morfología típica de *Cercozoa* spp., la cual se aprecia en nuestra Figura 13. De todas maneras, no podríamos afirmar dichos resultados hasta que no consigamos el aislamiento total de esta ameba y la caractericemos molecularmente.

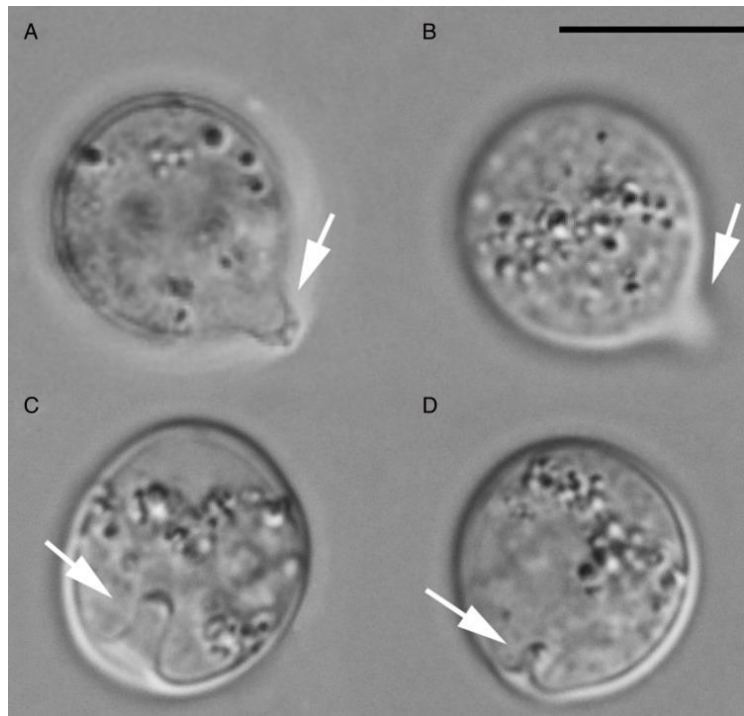


Figura 12: Representación de la morfología típica de *Cercozoa* spp. a una escala de 10µm. Elaboración de Dumack y colaboradores (2016)

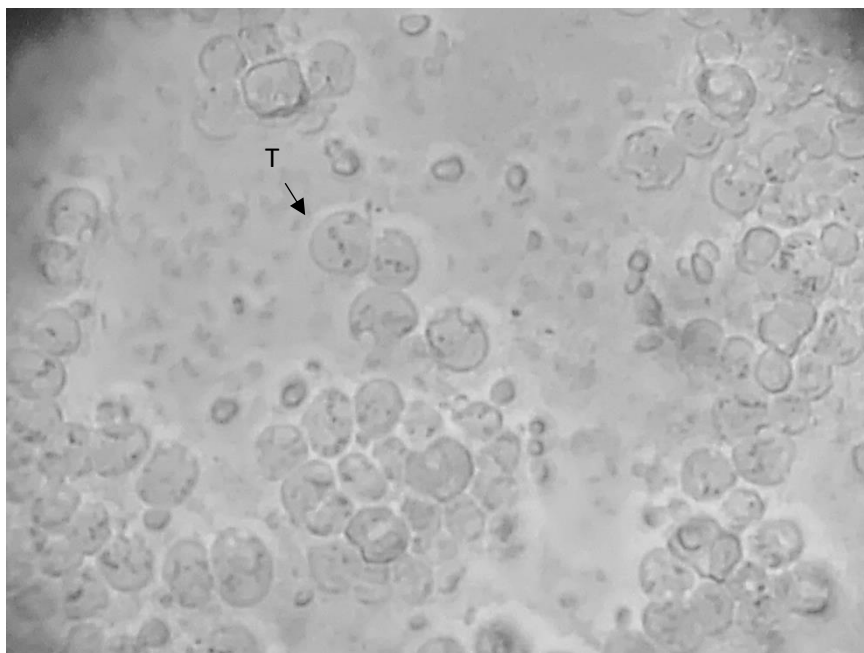


Figura 13: Fotografía de la muestra AF30 donde se aprecian los trofozoítos (T) cuya morfología coincide con la del género *Cercozoa*. Microscopio Leica Dmil, objetivo 20x. Capturada con el iPhone 11 Pro Max



Tras obtener toda la información sobre la patogenicidad y peligros producidos por las diferentes AVL encontradas en las muestras se procedió a contactar con los diferentes ayuntamientos en los que sus aguas habían dado positivo, con el fin de obtener la máxima información posible de estas fuentes públicas. Obtuvimos respuesta de los responsables de dos ayuntamientos donde nos informaron de donde provenían sus aguas y, además, uno de los responsables nos confirmaba que sus aguas eran supervisadas, se encontraban tratadas y aptas para el consumo humano.

Es importante destacar, que otros investigadores también han llevado a cabo estudios donde se han encontrado AVL en plantas de tratamientos de aguas e incluso en aguas embotelladas (Thomas *et al.*, 2008; Corsaro *et al.*, 2010; Özçelik *et al.*, 2012; Saburi *et al.*, 2017) en las que se ha observado una aplicación ineficaz de los métodos de filtración y eliminación de microorganismos en las aguas de consumo. A pesar de ello, se evidencia la gran resistencia que presentan las AVL en su estadio vegetativo frente a los métodos de desinfección de las aguas (Saburi *et al.*, 2017).

## 5. CONCLUSIONES

1. Se confirma la presencia de AVL (*Acanthamoeba*, *N. americana* y *V. vermiformis*) en las fuentes de aguas públicas estudiadas en Tenerife.
2. Nuestros resultados, evidencian la necesidad de tener en cuenta estos protozoos en la legislación aplicable a este tipo de aguas.
3. Las herramientas de biología molecular nos permiten la identificación de AVL en aguas de consumo, pudiendo así determinar el potencial riesgo para la salud con relación a las AVL.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abedkhozasteh H, Niyiyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M (2013). First Report of Hartmannella keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(3): 481-485
2. Abente S, Franco I, Samudio M, Guillén R (2019). *Situación del diagnóstico de Queratitis Amebiana en Paraguay*. Extraído el 25 de mayo de 2021 de <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/12/1047140/2307-3349-rspp-9-02-58.pdf>
3. Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV (1996). Amebic keratitis in a wearer of disposable contacts lenses due to a mixed Vahlkampfia and Hartmannella infection. *Ophthalmology*, 130(3): 485-494
4. Alves D de S, Moraes A, Nitz N, de Oliveira M, Hecht M, Gurgel-Gonçalves R, Cuba C (2012). Occurrence and characterization of Acanthamoeba similar to genotypes T4, T5 and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasilia, Federal District, Brazil. *Experimental Parasitology*, 131(2): 239-244
5. Balczun C, Scheid P (2017). *Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance*. Extraído el 12 de mayo de 2021 de [Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31511111/)
6. Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista G.A., Zamora-Muñoz C, Ibarra-Montes M.R., Ramírez-Flores E., Hernández-Martínez M.D. (2010). Acanthamoeba spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Experimental Parasitology*, 126: 54-58
7. Braithwaite, K. S., Ngo, C. N., & Croft, B. J. (2018). Confirmation that the Novel Cercozoa Phytocomonas venanatanis Is the Cause of the Disease Chlorotic Streak in Sugarcane. *Phytopathology*, 108(4): 487-494
8. CDC (2019). Free Living Amebic Infections. Extraído el 2 de junio de 2021 de [CDC - DPDx - Free Living Amebic Infections](https://www.cdc.gov/dpdx/free-living-amebic-infections/)
9. Claire Low A, Coyne M, Jones B (2015). Acanthamoeba queratitis: improving the Scottish diagnostic service for the rapid molecular detection of Acanthamoeba species. *Journal Medical Microbiology*, 64(7): 682-687

10. Corsaro D, Saucedo Pages G, Catalan V, Loret JF, 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
11. Delafont V, Brouke A, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y (2013). Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res*, 47: 6958-6965
12. De Jonckheere JF (2014). What do we know by now about the genus Naegleria? *Experimental Parasitology*. 145: S2-S9. Extraído el 19 de mayo de 2021 de [What do we know by now about the genus Naegleria? - ScienceDirect](#)
13. De Jonckheere JF, Brown S (1998). Is the free-living ameba Hartmannella causing keratitis? *Clinical Infectious Diseases*, 27(5): 1337-1338
14. Dumack, K., Müller, M. E., & Bonkowski, M. (2016). Description of *Lecythium terrestris* sp. nov. (Chlamydomphryidae, Cercozoa), a Soil Dwelling Protist Feeding on Fungi and Algae. *Protist*, 167(2): 93–105
15. Fierro I, Lalaguaña C, Pico A (2019). *Determinación de Acanthamoeba spp. y Naegleria fowleri mediante un análisis fenotípico en aguas termales de la provincia de Pichincha-Ecuador*. Extraído el 3 de junio de 2021 de [Repositorio Digital: Determinación de Acanthamoeba spp. y Naegleria fowleri mediante un análisis fenotípico en aguas termales de la provincia de Pichincha-Ecuador \(uce.edu.ec\)](#)
16. Geisen S, Koller R, Hünninghaus M, Dumack K, Urich T, Bonkowski M (2016). The soil food web revisited: diverse and widespread mycophagous soil protists. *Soil Biology Biochemistry*, 94:10–8
17. Gertiser *et al.* (2015). *Aspectos biológicos y epidemiológicos de amebas de vida libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en Acanthamoeba spp.* Extraído el 17 de junio de 2021 de [Aspectos biológicos y epidemiológicos de amebas de vida libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en Acanthamoeba spp \(uns.edu.ar\)](#)
18. Haniloo, A, Pezeshki, A, Mahmmodzadeh, A, et al. (2017). Genotyping of *Acanthamoeba* spp. from water sources from Northwestern Iran. *Acta Parasitologica*, 62(4): 790-795

19. Harder, C. B., Rønn, R., Brejnrod, A., Bass, D., Al-Soud, W. A., & Ekelund, F. (2016). Local diversity of heathland Cercozoa explored by in-depth sequencing. *The ISME Journal*, 10(10): 2488–2497
20. Heidegger M (1995). *The fundamental concepts of metaphysics*. Extraído el 22 de mayo de 2021 de [The Fundamental Concepts of Metaphysics: World, Finitude, Solitude - Martin Heidegger - Google Libros](#)
21. Irwin, N., Tikhonenkov, D., Hehenberger, E., Mylnikov, A., Burki, F. and Keeling, P. (2019). Phylogenomics supports the monophyly of the Cercozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 130: 416-423
22. Kao P. Hsu B. Chen N. Huang C. Ji D. Chen J. Lin W. Huang S. Chiu Y. (2012). Molecular detection and comparison of Acanthamoeba genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. *Environ. Monit. Assess*, 184: 4335–4344
23. Khan N.A. (2009). *Acanthamoeba: biology and pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
24. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J (2015). An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*; 22: 10
25. Lorenzo-Morales J, Ortega Rivas A, Foronda P. Martínez E, Valladares B (2005). Isolation and identification of pathogenic Acanthamoeba strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*, 95: 273-277
26. Maffrand R, Pizzi R, Páez M, Tomas A, Maffand C, Pizzi H (2019). *Queratitis por Acanthamoeba. Infección ocular emergente. Reporte de casos*. Extraído el 25 de mayo de 2021 de <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/RSD/article/view/21129/23472>
27. Maghsood A. H. Sissons J. Rezaian M. Nolder D. Warhurst D. Khan N. A. (2005). Acanthamoeba genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J. Med. Microbiol*, 54 (Pt 8): 755–759
28. Magnet A, Fenoy S, Galván A.L., Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, Del Aguila C (2013). A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Research*, 47(19): 6966-6972

29. Mahmoudi M, Taghipour N, Eftekhar M, Haghighi A, Karanis P (2012). Isolation of Acanthamoeba species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitology Research*, 110: 473-477
30. Özçelik S, Coşkun, KA, Yünlü Ö, Alim A, Malatyalı E (2012). The Prevalence, Isolation and Morphotyping of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from Tap Water and Environmental Water Sources in Sivas. *Turkiye Parazitol Dergisi*, 36 (4): 198-203
31. Page FC (1988). A new key to fresh water and soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK*, 122 pp.
32. Pazoki, H., Niyayati, M., Javanmard, E., Lasjerdi, Z., Spotin, A., Mirjalali, H., & Karanis, P. (2020). Isolation of *N. philippinensis* and *N. americana* strains from irrigation waters of farmland soils in Iran. *Environmental science and pollution research international*, 27(19): 24568–24573
33. Qvarnstrom Y, da Silva A.J., Schuster F. L., Gelman B.B., Visvesvara G.S. (2009). Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *Journal Infect Dis*, 15: 1139-1142
34. Reyes-Batlle, M., Díaz, F. J., Sifaoui, I., Rodríguez-Expósito, R., Rizo-Liendo, A., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2021). Free living amoebae isolation in irrigation waters and soils of an insular arid agroecosystem. *The Science of the total environment*, 753, 141833
35. Reyes-Batlle, M., Wagner, C., Zamora-Herrera, J., Vargas-Mesa, A., Sifaoui, I., González, A. C., López-Arencibia, A., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2016). Isolation of thermotolerant *Vermamoeba vermiformis* strains from water sources in Lanzarote Island, Canary Islands, Spain. *Acta parasitológica*, 61(3): 650–653
36. Rodríguez A, Morales J (2019). Meningoencefalitis Amebiana Primaria y Amebas de Vida Libre. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(19): 51-56
37. Saburi E, Rajaii T, Behdari A, Hasan-Kohansal M, Vazini H (2017). Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic review. *Journal of Parasitic Diseases*, 41 (4): 919-928

38. Sandí EA, Moreira LR (2015). *Amebas de vida libre como agentes de encefalitis en el ser humano*. Extraído el 25 de mayo de 2021 de [microbiologos.cr/Revistas/4.pdf](http://microbiologos.cr/Revistas/4.pdf)
39. Scheid, P. L., Lãm T. T., Sinsch U., Balczun C (2019). *Vermamoeba vermiformis* as etiological agent of a painful ulcer close to the eye. *Parasitology research*, 118(6): 1999-2004
40. Scheikl U, Sommer R, Kirschner A, Rameder A, Schrammel B, Zweimüller I, Wesner W, Hinker M, Walochnik J (2014). *Free-living amoebae (FLA) co-occurring with legionellae in industrial waters*, Extraído el 17 de junio de 2021 de [Free-living amoebae \(FLA\) co-occurring with legionellae in industrial waters - ScienceDirect](http://Free-living amoebae (FLA) co-occurring with legionellae in industrial waters - ScienceDirect)
41. Schuster F, Visvesvara G (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9): 1001-1027. Extraído el 22 de mayo de [Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals - ScienceDirect](http://Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals - ScienceDirect)
42. Shyam K, Tejan N, Ghoshal U, Sharma P, Kalra SK (2020). *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Experimental Parasitology*. 208. Extraído el 18 de junio de 2021 de [Acanthamoeba and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis - ScienceDirect](http://Acanthamoeba and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis - ScienceDirect)
43. Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Khan NA (2016). Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Tropica*, 164: 375–394
44. Siddiqui, R., Makhlouf, Z., & Khan, N. A. (2021). The Increasing Importance of *Vermamoeba vermiformis*. *The Journal of eukaryotic microbiology*, e12857. Advance online publication
45. Smirnov A, Chao E, Nasonova E, Cavalier-Smith T (2011). Revised classification of non-mycetozoa naked lobose amoebae (Amoebozoa). *Protist*, 162(4): 545-570
46. Tice AK, Shadwick LL, Fiore – Donno AM, Geisen S, Kang S, Schuler GA, Spiegel FW, Wilkinson KA, Bonkowski M, Dumack K, Lahr DJ, Voelcker E, Clau BS, Zhand J, Brown MW (2016). Expansion of the molecular and

- morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biology Direct*, 11(1): 69
47. Thomas V, Loret J.F., Jousset M, Greub G (2008). Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiology*, 10: 2728-2745
48. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neki S, Makni F, Ayadi A (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathology Biol (Paris)*, 60: 399-405
49. Visvesvara G.S., Moura H, Schuster F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic freelifving amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology Med Microbiology*, 50: 1-26