

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Papel de amebas de vida libre como vehículos de patógenos
implicados en la seguridad alimentaria**

**Free-living amoeba role as vehicles of pathogens involved in
food safety**

Diego Miguel Forte Trujillo

Tutor: José Enrique Piñero Barroso

Cotutora: Atteneri López Arencibia

Índice

Resumen.....	3
Palabras clave.....	3
Abstract	3
Keywords.....	3
Glosario	4
1. Introducción	5
2. Objetivo	6
3. Materiales y Métodos	7
4. Resultados y Discusión	8
Asociación con norovirus	9
Asociación con hongos y levaduras.....	10
Asociación con bacterias.....	11
5. Conclusiones.....	15
Bibliografía	17

Resumen

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos de distribución cosmopolita en el entorno y que contribuyen a la contaminación microbiológica de las fuentes de agua y alimentos. A pesar de que su alimentación se basa en otros microorganismos, diversos estudios han demostrado que algunos de estos presentan diferentes grados de resistencia frente a la nutrición y digestión ejercida por las AVL. Esto, sumado al hecho de que las AVL tienen la capacidad de resistir diversas condiciones adversas, provoca que estos organismos se conviertan en vehículos y reservorios accidentales de los microorganismos que trataban de digerir. Algunos de estos microorganismos son virus, hongos y bacterias que están implicados como agentes patógenos que se transmiten a través del consumo de alimentos y aguas. Dada la ubicuidad de las AVL, las posibles interacciones entre estas y los microorganismos patógenos mencionados podrían ser más comunes de lo que se cree. Por ello, resulta de interés tratar de recopilar información sobre este tema y determinar el riesgo de que las AVL puedan vehicular patógenos que contaminen aguas y alimentos.

Palabras clave

Amebas de vida libre, *Acanthamoeba*, trofozoítos, quistes, vehículos, reservorios, transmisión por alimentos, transmisión por aguas.

Abstract

Free-living amoebas (FLA) are protistic organisms located ubiquitously in the environment and they contribute to microbiological contamination of water sources. Although their diet is based on other microorganisms, several studies have shown that some of these microorganisms have varying degrees of resistance to nutrition and digestion exerted by FLA. This, coupled with the fact that FLA have the ability to withstand various adverse conditions causes these organisms to become accidental vehicles and reservoirs of the microorganisms they were trying to digest. Some of these microorganisms are viruses, fungi, and bacteria that are involved as pathogens that are transmitted through food and water consumption. Given the ubiquity of FLA, the possible interactions between these and the aforementioned pathogenic microorganisms might be more common than it is thought. Therefore, there is an interest in trying to collect information on this topic and determining the risk that FLA may act as vehicles of pathogens that contaminate water or food sources.

Keywords

Free living amoeba, *Acanthamoeba*, trophozoite, cyst, vehicles, reservoir, foodborne, waterborne.

Glosario

-AVL / FLA: Ameba de vida libre / Free living amoeba.

-HuNov: Human norovirus.

-MNV-1: Murine norovirus 1.

-FCV: Feline calicivirus.

-Escherichia coli O157:H7: Serotipo de *E. coli* que causa infección alimentaria a través de una verotoxina. La letra "O" hace referencia al número antígeno de la pared celular, mientras que "H" es el antígeno del flagelo.

-Escherichia coli DH5 α : Cepa de *E. coli* que no presenta potencial patogénico alguno. Es empleado con propósitos de clonación de esta especie bacteriana.

1. Introducción

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos que se localizan ubicuamente en casi cualquier ecosistema natural, encontrándose en grandes cantidades en el agua, suelo o aire y teniendo un importante papel en los ecosistemas como reductores y regeneradores de la biomasa bacteriana. A pesar de que existe un gran número de géneros y especies de estas amebas, únicamente unas pocas especies del género *Acanthamoeba spp.*, así como las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata* tienen especial relevancia en los seres humanos debido a su alto potencial patogénico e infeccioso.

Por lo general, las AVL no suelen estar implicadas como patógenos principales introducidos a través del tracto digestivo humano. Sin embargo, existen numerosos estudios que señalan la relación de especies del género *Acanthamoeba spp.*, con infecciones de muy variado tipo. Se ha demostrado que este género de AVL es capaz de transportar en su interior distintos agentes patógenos, tales como bacterias (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, etc.), norovirus, levaduras y protozoos. Por tanto, una vez que estas AVL llegan al tracto digestivo, podrían liberar estos agentes patógenos, siendo capaces de esta manera de vehicular a estos organismos y posibilitando el que produzcan las infecciones y las enfermedades que les son comunes.

Esta capacidad, sumado al hecho de que muchas AVL se encuentran presentes en los alimentos y que no existen métodos estandarizados sencillos ni legislación que obligue a su detección en los mismos, provoca que este tipo de microorganismos pueda convertirse en un importante foco de infección para el ser humano.

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de aquellos artículos e investigaciones que hayan estudiado la capacidad de las amebas de vida libre (AVL) como vehículos transportadores de otros microorganismos y patógenos al interior de los seres humanos.

3. Materiales y Métodos

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica se emplearon dos bases de datos para la búsqueda, filtración y selección de artículos y estudios científicos. Estas bases de datos fueron: “Pubmed” y “ResearchGate”. Los términos empleados para realizar la búsqueda de artículos fueron “Amoeba”, “FLA”, “*Acanthamoeba*” en combinación con “shelter”, “vehicle”, “Reservoir”, “host”, “Foodborne” y “Waterborne”. También se realizó una búsqueda por páginas web para identificar posibles artículos que no estuvieran publicados en revistas o en esas bases datos pero que hubieran sido reseñados de algún modo.

De todos los artículos disponibles sólo se escogieron aquellos que tuvieran especial relevancia con el objetivo principal de esta revisión. Además, se escogieron únicamente aquellos que estuvieran fechados a partir del año 2009, tratando así de obtener cierto grado de actualidad para esta revisión.

4. Resultados y Discusión

Las amebas de vida libre (AVL) se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, lo que deriva en la contaminación de fuentes de agua y alimentos destinados al consumo humano, así como la posible infección de los piensos y el ganado que posteriormente pasará a consumo humano. Aunque sólo un pequeño grupo de estas poseen potencial patogénico, se ha demostrado en múltiples ocasiones la relación existente entre las AVL y otros microorganismos. Esta relación ha sido comprobada en determinadas especies de amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, las cuales actúan como vehículos hospedadores de microorganismos patógenos hacia el ser humano. Cabe señalar que es precisamente este género el que más ha sido empleado como modelo de estudio para interacción con otros microorganismos, destacando especialmente los estudios con *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*.

Las amebas del género *Acanthamoeba* no sólo están presentes en el medio ambiente, sino que muchas persisten en entornos artificiales, incluyendo aguas de piscinas cloradas, sistemas de distribución de aguas para consumo, torres de refrigeración e incluso en redes de agua de hospitales. Estas amebas poseen dos fases en su ciclo de vida: fase activa o de trofozoíto, y fase de quiste. La fase de trofozoíto permite a estos organismos alimentarse o replicarse, teniendo la capacidad de entrar en la fase de quiste cuando las condiciones ambientales se vuelven adversas (condiciones tales como desecamiento, escasez de alimentos, cambios bruscos de temperatura, etc.). Los quistes de *Acanthamoeba* son capaces de resistir condiciones ambientales hostiles, así como numerosos agentes físicos y químicos que normalmente inactivarían a los trofozoítos.

Las amebas de vida libre también pueden actuar como patógenos oportunistas causando enfermedades graves, aunque se ha de señalar que las principales infecciones se producen a través del uso de lentes de contacto y exposición a aguas recreacionales infectadas por estos organismos, por lo que las infecciones no están asociadas normalmente a la ingestión de alimentos o aguas.

Sin embargo, se ha descubierto que numerosos microorganismos pueden permanecer aislados en el interior de estas amebas. Esto les proporciona un medio más adecuado para su supervivencia frente a condiciones adversas, además de que de esta manera evitan ser detectadas por los métodos de diagnóstico más comunes. Cuando un quiste de *Acanthamoeba* que transporta microorganismos entra al tracto digestivo humano puede liberar a los mismos y exponer al ser humano a infecciones de patógenos que no habrían sido capaces de llegar de otra forma. Pero los microorganismos no sólo persisten en los quistes, ya que hay numerosos estudios que apuntan a que algunos de estos organismos son capaces de persistir durante un determinado período de tiempo en el interior de los trofozoítos de *Acanthamoeba*.

Asociación con norovirus

Los norovirus humanos son altamente contagiosos, estimándose que son responsables de unos 21 millones de casos de enfermedades gastrointestinales sólo en Estados Unidos. La mayor parte de los brotes de este tipo son provocados por la transmisión de estos virus a través de aguas y alimentos, principalmente de alimentos de hojas verdes contaminados durante la preparación o el contacto con aguas contaminadas. Sin embargo, la transmisión e infección de norovirus a través del ambiente no está demasiado estudiada. En este sentido, se sugirió que *Acanthamoeba* podía jugar un importante papel en la transmisión de este tipo de microorganismos.

Esta interacción entre *Acanthamoeba* y norovirus ha sido estudiada por diversos grupos. Uno de estos estudios [1] trató de demostrar cómo los trofozoítos de dos especies de este género, *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, podían actuar como reservorios para la supervivencia y la transmisión de norovirus humanos (HuNov). Para ello, estudiaron la asociación de estas dos especies con dos tipos de norovirus (MNV-1 y FCV) bajo condiciones de cultivo reproducibles.

En dicho estudio se comprobó que las variantes de norovirus de tipo FCV no poseían asociación alguna con las dos especies de *Acanthamoeba*, mientras que las del tipo MNV-1 se adherían con facilidad a las amebas. Se observó que las amebas inoculadas con este norovirus no sufrían deficiencias morfológicas y se mantenían viables. En cambio, se observó que la cantidad de norovirus inoculados en cultivos de ameba se reducía en aproximadamente un 80% tras ocho días, pero a partir de entonces su número permanecía estable en la especie de *A. castellanii*, mientras que continuaban en descenso en el caso de *A. polyphaga*. Por tanto, se demostraría de esta manera que este tipo de norovirus podrían persistir y conservar su capacidad infectiva tras haber sido internalizado por *A. castellanii*, lo que convierte a esta especie en posible vehículo de norovirus.

Un segundo estudio [2] derivado del anterior, trató de demostrar cómo los principales alimentos frescos afectados por norovirus podían infectarse con *Acanthamoeba* al entrar en contacto con aguas o la superficie de otros alimentos contaminados. Aquí, se corroboró que la asociación entre norovirus y amebas no dificultaba la transferencia de AVL hacia el alimento. Tampoco se observó que hubiera diferencias significativas en la capacidad de transmisión de amebas en función del alimento ni del tipo de agua empleada (agua contaminada con amebas y agua contaminada con la asociación ameba-norovirus). Además, se observó que la eficiencia de transferencia de AVL hasta los alimentos era mayor en aquellas aguas donde la concentración de AVL era muy superior que las que presentaban aguas con una menor concentración.

Por el contrario, se observó que la capacidad de transferencia de *Acanthamoeba* desde la superficie de los alimentos hacia los productos frescos era muchísimo más limitada, hallándose únicamente unas pocas amebas tras la transferencia. Esto se atribuyó al hecho de que las diferentes AVL que se transmiten por el agua son capaces

de asociarse a un mayor número de microorganismos y llegar incluso a formar *biofilms* de variado tipo que ayuden a la supervivencia de las AVL, condiciones que no son fácilmente reproducibles en un ensayo de laboratorio. El mismo trabajo también señaló que es muy posible que las condiciones controladas del experimento hayan deteriorado la capacidad de transmisión de AVL desde la superficie de los alimentos hacia los productos frescos, pero que las diferencias seguían siendo notablemente significativas al comparar la transmisión directa de amebas desde fuentes de agua en contraste con la transmisión desde la superficie de otros alimentos.

Por otra parte, se ha demostrado que no sólo los adenovirus pueden asociarse a amebas del género *Acanthamoeba*, existiendo multitud de otros tipos de virus que pueden persistir tras su entrada al trofozoíto o el quiste de esta ameba. Virus como coxsackievirus y adenovirus, y aquellos pertenecientes a géneros tales como *Mimiviridae*, *Marseilleviridae*, *Pandoravirus*, *Phitovirus*, *Faustovirus* y *Mollivirus* han sido aislados o inoculados con éxito en el interior de AVL a lo largo de los años [3]. De todos estos, cabe mencionar que los coxsackievirus eran capaces de mantener su potencial infectivo incluso tras finalizar un ciclo completo de seis meses de endocitosis y exocitosis de la ameba.

Asociación con hongos y levaduras

Existen diversos hongos y levaduras microscópicos que son capaces de causar enfermedad en el ser humano. Al igual que con otros microorganismos potencialmente patógenos, existen metodologías y procesos que permiten reducir o incluso eliminar el riesgo de infección por estos microorganismos al consumir alimentos o aguas. Sin embargo, se ha visto que existe asociación entre estos microorganismos y las AVL, más concretamente con *Acanthamoeba*.

Una de estas asociaciones fue descrita [4] en el hongo *Cryptococcus neoformans* [4], el cual mostraba un comportamiento paralelo al de macrófagos humanos cuando interacciona con *Acanthamoeba castellanii*. Se observó que la cápsula que posee *C. neoformans* no sólo lo protege frente a mecanismos de fagocitosis realizados por macrófagos, sino que además parecía disminuir la capacidad de endocitosis por parte de la ameba. En ausencia de esta cápsula, *A. castellanii* realizaba la ingesta de *C. neoformans* con mayor facilidad. Sin embargo, a diferencia de los macrófagos, el agrandamiento de la cápsula del hongo no parecía tener relevancia con su capacidad para evitar ser fagocitado por la ameba. En este sentido, se debe señalar que diferentes cepas del hongo presentaban ligeras diferencias en los polisacáridos con los que sintetizan sus cápsulas, pudiendo ser este hecho el que les proporciona mayor o menor capacidad defensiva frente a las AVL en lugar del diámetro de la cápsula.

Por otra parte, se observó que en el caso de *C. neoformans* introducidos en la ameba, éstos eran capaces de abandonar el interior de la misma por vías no líticas. Adicionalmente, se comprobó que determinadas cepas del hongo eran incapaces de abandonar la ameba. Curiosamente, estas cepas son las que presentaban mayor tasa de exocitosis en macrófagos, a diferencia de aquellas que poseían mayores dificultades de

abandonar un macrófago y que, sin embargo, eran capaces de abandonar las amebas. También se observó que la exocitosis en amebas comenzaba aproximadamente unas dos horas más tarde que en el caso con macrófagos. Todo esto permitiría la supervivencia de *C. neoformans* mientras permanezca en el interior de *A. castellanii*, ya que facilita su diseminación así como la protección frente a posibles agentes químicos o biocidas que de otra forma acabarían con sus colonias.

Asociación con bacterias

Las bacterias patogénicas transmitidas por las aguas y los alimentos son una de las causas más comunes de enfermedad en el ser humano, acarreando importantes consecuencias tanto en la salud pública como en aspectos económicos. A pesar de los intensos protocolos de desinfección y monitorización de la higiene durante la producción y el procesamiento de las aguas y los alimentos, las bacterias pueden persistir en estos entornos, principalmente debido al desconocimiento de determinadas rutas o mecanismos de transmisión aún no completamente estudiados. En este sentido, las AVL podrían implicarse como vehículos de transmisión de estas bacterias.

Un estudio señaló [5] que a pesar de que las AVL son capaces de digerir bacterias y otros microorganismos para nutrirse, existen determinadas bacterias que pueden resistir esta digestión y desarrollarse con normalidad en el interior de las mismas, observándose que los quistes de *Acanthamoeba castellanii* proporcionaban condiciones perfectas para la protección de las bacterias que internalizaban. Esta interacción fue estudiada empleando cinco bacterias diferentes implicadas en la transmisión a través de los alimentos: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*.

En este estudio [5] se comprobó que con excepción de *C. jejuni*, las bacterias podían sobrevivir al proceso de enquistamiento, persistiendo en el citosol celular y siendo protegidas del efecto de los agentes antibióticos empleados. Además, al forzar la salida de estas bacterias al medio, éstas continuaban siendo capaces de crecer en condiciones normales. Sin embargo, este estudio mostró diferencias en los rangos de tiempo en las que las distintas bacterias podían persistir en el interior de *A. castellanii*. Se pudo observar cómo *S. enterica* podía persistir entre 3 semanas y 3 meses mientras que *L. monocytogenes* persistía hasta dos semanas. Por el contrario, *Y. enterocolitica* y *E. coli* sólo persistían entre 2 y 3 días, debido principalmente a una falta de nutrientes. Durante la formación del quiste, una gran cantidad de agua y nutrientes son expulsados al exterior del citosol al tiempo que la ameba se condensa, lo que provoca que el interior no sea un medio especialmente favorable para el desarrollo de bacterias. En este sentido, sólo aquellas que tengan mayor resistencia o posean otro tipo de mecanismos podrían persistir durante más tiempo.

En el caso de *C. jejuni*, el estudio de Lambrecht *et al.*, (2015) señaló que algunas células viables de esta especie podían observarse en el interior de *A. castellanii* a través de microscopía electrónica, pero que su “viabilidad” no permitía luego recuperarlas y cultivarlas. Alternativamente se teorizó que en el momento en el que la ameba pasaba

de su estado quístico al de trofozoíto, *C. jejuni* era liberado al exterior sólo para ser inmediatamente consumido por los trofozoítos recién formados, por lo que se especuló acerca de la posible existencia de determinados mecanismos que permitan que algunas especies de bacteria en específico sean capaces de sobrevivir al proceso de salida del quiste.

A este respecto, el estudio de Vieira *et al*, (2017) descubrió que la interacción y supervivencia de *C. jejuni* en *Acanthamoeba polyphaga* se debía a una extensa variabilidad genética y diferencias entre cepas. Se demostró que largos períodos de incubación a 37°C permitían que estas cepas específicas escaparan al medio extracelular, se multiplicaran y volvieran a infectar nuevas células de *A. polyphaga*, estimándose que los procesos de reinfección tenían mayor relevancia en la supervivencia de *C. jejuni* que la multiplicación intracelular en el interior de amebas [6]. Adicionalmente, se observó que la cepa 81-176 de *C. jejuni* podía transmitir un determinado plásmido a la cepa G1 de la misma especie, lo que confería una resistencia a la tetraciclina ocho veces mayor en esta última. Aunque el intercambio genético es un mecanismo común en cepas bacterianas, el hecho de que puedan realizar este mecanismo durante o tras la infección de una ameba les dotaría de una mayor supervivencia.

Existen también artículos donde se estudia la interacción entre *A. castellanii* y *Listeria monocytogenes* [7]. En ellos se sugirió que al menos la bacteria era capaz de sobrevivir durante 72 horas en el interior de los quistes de la ameba, pudiendo en algunos casos llegar a replicarse en su interior. Esta sugerencia se muestra contraria al de muchos estudios anteriores con *Acanthamoeba polyphaga*, en los que a pesar de que no se observaba una depredación de *L. monocytogenes* tampoco se llegó a observar células viables tras la internalización. Esto se debe a que la bacteria sí que es digerida con éxito por los trofozoítos de *A. polyphaga* y *A. castellanii*.

Además de lo anteriormente descrito, se observaron algunos comportamientos extraños cuando se daba la interacción entre *Listeria* y *Acanthamoeba* spp. Para empezar, se comprobó que *L. monocytogenes* se agrupaba formando conjuntos que se adherían a la superficie de la ameba durante un período de entre 10 y 30 minutos. Tras este tiempo, *Acanthamoeba* spp. realizaba la internalización de las bacterias y las digería con normalidad. La adhesión a la superficie se realizaba a través de unos determinados filamentos, pero no se pudo comprobar si estos eran emitidos por *L. monocytogenes* o por *Acanthamoeba* spp. Dado que la motilidad es un mecanismo bacteriano para evitar depredadores, se sugirió que esta agrupación podría ser una estrategia de la ameba para contrarrestar dicho mecanismo. Aun así, debe hacerse notar que durante ese período de 10-30 minutos podrían darse otras circunstancias que terminen provocando la disociación entre ameba-bacteria, produciendo así un transporte bacteriano efectivo.

Sorprendentemente, este mismo estudio [7] verificó que, a pesar de que *Acanthamoeba* trata de internalizar y digerir a *L. monocytogenes*, los recuentos

bacterianos eran mucho mayores cuando se cultivaban junto a la ameba que cuando se realizaban cultivos aislados. Se sugirió entonces que *L. monocytogenes* se mantenía estable en el medio aprovechando determinados desechos metabólicos producidos por *Acanthamoeba* o incluso aprovechando material de amebas muertas. Con todos estos datos, se concluyó que *Acanthamoeba* spp. no actuaba como reservorio de *Listeria monocytogenes*, pero que activaba determinados mecanismos que permitían a la bacteria replicarse muy rápidamente, incrementando el riesgo de contaminación de alimentos.

Por otra parte, se ha visto que la bacteria *Arcobacter butzleri* puede resistir la digestión de la especie *A. castellanii* durante aproximadamente 240 horas [8]. Sin embargo, esta resistencia no fue presentada por todas las cepas de *A. butzleri* estudiadas, existiendo una que no fue capaz de replicarse y sobrevivir en el interior de la ameba. Esto sugiere que diferencias entre cepas bacterianas de la misma especie podrían determinar el tiempo de supervivencia y la prevalencia de las mismas en el interior de diferentes AVL.

Otro de los trabajos analizados en la bibliografía se centraba en el estudio de *Mycobacterium shottsii* y *Mycobacterium pseudoshottsii* aislados en bazos y lesiones dérmicas de la especie *Morone saxatilis* (lubina rayada atlántica) de la Bahía de Chesapeake [9]. Estas micobacterias crecen a una temperatura óptima de entre 23 y 25°C, coincidiendo con la temperatura óptima de crecimiento de diversas amebas, como *A. polyphaga*. A pesar de que se demostró que ambas micobacterias eran internalizadas por esta ameba, se observó que la viabilidad de las mismas resultaba mucho menor que con otras micobacterias previamente estudiadas, como *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium marinum*. Además, a diferencia de estas dos últimas, *M. shottsii* y *M. pseudoshottsii* demostraban una menor resistencia a los trofozoítos de *A. polyphaga*. A pesar de esto, estudios previos han sugerido que las micobacterias supervivientes exhiben una mayor capacidad patogénica en modelos animales, lo que implica la existencia de algún tipo de selección genética mientras permanecen internalizadas.

Yersinia pseudotuberculosis es otra bacteria patógena encontrada en los alimentos que ha sido objetivo de estudio [10]. Al igual que muchas otras bacterias, *Y. pseudotuberculosis* es capaz de sobrevivir en el interior de los trofozoítos de *A. castellanii*, especialmente cuando era cultivada a unos 37°C. Se observó que la estrategia de esta bacteria al interactuar con amebas era muy similar al de otros patógenos como *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis* y *Legionella pneumophila*. Todas estas bacterias sobreviven en el interior de vacuolas de la propia ameba, previniendo la acidificación del nicho intravacuolar como estrategia de supervivencia. Curiosamente, y a pesar de formar parte del mismo género, *Yersinia enterocolitica* sobrevive en el interior del citosol de *A. castellanii*, lo que supone una clara diferencia respecto a la estrategia adoptada por *Y. pseudotuberculosis*.

En este mismo estudio [10] se observó la reacción de la cepa DH5α de *Escherichia coli* al cultivarse junto *A. castellanii*. Se comprobó que *E. coli* empleaba estrategias de supervivencia extracelulares, resistiendo la fagocitosis por parte de la

ameba. Nuevamente, existe una diferencia de estrategia entre esta cepa y la de *E. coli* O157:H7, la cual sí opta por desarrollarse en el interior de las vacuolas de *A. castellanii*. A pesar de esto, se observó que el número de células viables era mucho mayor en aquellas *E. coli* que empleaban la supervivencia extracelular. Además, se sugirió que el rápido crecimiento de *E. coli* en el medio podía provocar una competencia por los nutrientes o incluso provocar un descenso del pH del medio debido a la formación de metabolitos secundarios, lo que podría forzar a la ameba a entrar en fase de quiste.

Adicionalmente, en un estudio acerca de la interacción entre la bacteria *Legionella pneumophila* y *biofilms* localizados en tuberías y depósitos de agua de hospitales o con uso recreativo, se hicieron observaciones de cómo se realizaban las asociaciones entre esta bacteria y el biofilm al introducir en el mismo una AVL, *Vermamoeba vermiformis* [11]. En este caso se observó que *V. vermiformis* digería las bacterias de *L. pneumophila* en el interior del *biofilm* en condiciones de temperatura inferiores a los 20°C. Sin embargo, cuando se incrementaba la temperatura por encima de los 25°C, eran las células bacterianas las que se multiplicaban y colonizaban el medio, llegando incluso a parasitar a la ameba.

Respecto a *Legionella pneumophila*, se ha demostrado que actúa como patógeno de muchas especies de AVL, incluidas las del género *Acanthamoeba* [12]. Esto se debe a que el ciclo de vida intracelular de esta bacteria actúa de forma muy similar tanto en amebas como en mamíferos, causando la lisis celular en las etapas más avanzadas de la infección. De esta forma, *L. pneumophila* emplearía diferentes AVL para replicarse y posteriormente ser liberadas al medio provocando la lisis de las amebas.

Pero del mismo modo que bacterias como *L. pneumophila* actúan como patógenas y depredadoras de AVL, también hay bacterias que actúan en simbiosis con ellas. En numerosos aislamientos de *Acanthamoeba* se ha encontrado la presencia de bacterias patógenas del ser humano como *Chlamydia trachomatis*, así como otras pertenecientes a este género [12]. De todas estas, la asociación que *Protochlamydia amoebophila* presenta respecto a *Acanthamoeba* es una de las más estudiadas. Cuando se produce esta asociación, las células infectivas de *L. pneumophila* ven alterado sus procesos metabólicos, reduciendo enormemente su crecimiento y replicación. De esta forma, cuando se produce la lisis celular, las nuevas formas infectivas presentan una capacidad de infección mucho menor a la normal, lo que dificulta enormemente que puedan infectar nuevas AVL. Curiosamente, las amebas que se recuperan de este tipo de infecciones no presentan un incremento en sus capacidades defensivas frente a futuras infecciones por *L. pneumophila*. Sin embargo, las nuevas generaciones de AVL nacidas tras una infección de este tipo sí que presentan un mecanismo de defensa más potente que sus predecesoras, lo que sugiere que existe algún tipo de mecanismo de adaptación o memoria inmunológica. Por supuesto, *Acanthamoeba* no es la única beneficiada de esta asociación, pues al igual que ocurre con muchas otras interacciones, la ameba proporciona protección y nutrientes a la *P. amoebophila* que hospeda.

Por último, habría que mencionar que existen casos en los que la supervivencia de una bacteria patógena se le ha atribuido erróneamente a una asociación con AVL. Tal es el caso de *Shigella sonnei*, de la que se pensaba que su supervivencia en determinados países de transición donde las condiciones de vida e higiene habían sido mejoradas recientemente, se debía a amebas como *Acanthamoeba castellanii*, que actuaban como reservorios protectores de la bacteria. Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Jaine *et al*, (2018) demostró que esta bacteria no sólo era digerida por la ameba en la mayoría de los casos, sino que además, muy pocas células viables eran capaces de abandonar la ameba. Adicionalmente, ninguna de las bacterias viables presentaba mejora alguna en su capacidad infectiva. Finalmente, este mismo estudio [13] proponía dos hipótesis alternativas que explicaran la prevalencia de esta bacteria en ausencia del mecanismo de asociación con *Acanthamoeba*, el cual se le había atribuido hasta el momento.

5. Conclusiones

De los estudios que se han tenido en cuenta en esta revisión para evaluar la interacción entre AVL y otros microorganismos podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado que existen numerosas asociaciones entre las AVL del género *Acanthamoeba* y diversos microorganismos, tanto patógenos como no patógenos. Esto implica que podrían existir más relaciones entre ambos grupos que todavía no han sido estudiadas.
- Muchos microorganismos patógenos tienen la capacidad de sobrevivir en el interior de los quistes y los trofozoítos de las AVL. Esto depende de diversos factores como pueden ser las condiciones ambientales, adaptaciones genéticas de diferentes cepas y otros tipos de mecanismos aún no identificados.
- Además de proporcionar refugio y protección durante un tiempo limitado, la interacción entre AVL y microorganismos patógenos favorece en algunas bacterias una mayor capacidad de replicación, un cambio del potencial infeccioso e incluso el desarrollo de una mayor resistencia a la infección por parte de las AVL.
- Las AVL dificultarían, en algunos casos, la detección mediante métodos estándar de aquellos microorganismos que vehiculizan.

Bibliografía

1. Hsueh T-Y, Gibson KE. 2015. Interactions between human norovirus surrogates and *Acanthamoeba* spp. Applied and Environmental Microbiology 81:4005–4013.
2. Hsueh T-Y, Gibson KE. 2015. Transfer of *Acanthamoeba* spp. to fresh produce from water and environmental surfaces. Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254
3. Carsten B, Patrick LS. 2017. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance MDPI
4. Chrisman CJ, Alvarez M, Casadevall A. 2010. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and Nonlytic Exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii* Applied and Environmental Microbiology, p. 6056–6062
5. Lambrecht E, Baré J, Chavatte N, Bert W, Sabbe K, Houf K. 2015. Protozoan cysts act as a survival niche and protective shelter for foodborne pathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 81:5604–5612
6. Vieira A, Ramesh A, Seddon AM, Karlyshev AV. 2017. CmeABC multidrug efflux pump contributes to antibiotic resistance and promotes *Campylobacter jejuni* survival and multiplication in *Acanthamoeba polyphaga*. Applied Environmental Microbiology 83:e01600-17.
7. Schuppler M. 2014. How the interaction of *Listeria monocytogenes* and *Acanthamoeba* spp. affects growth and distribution of the food borne pathogen. Applied Microbiology and Biotechnology 98:2907–2916
8. Villanueva MP, Medina G, Fernández H. 2015. *Arcobacter butzleri* survives within trophozoite of *Acanthamoeba castellanii*. Revista Argentina de Microbiología, 2016; 48(2):105-109
9. Gupta T, Fine-Coulson K, Karls R, Guathier D, Quinn F. 2014. Internalization of *Mycobacterium shottsii* and *Mycobacterium pseudoshottsii* by *Acanthamoeba polyphaga*. Canadian Journal of Microbiology
10. Santos-Montañez J, Benavides-Montañón J, Hinz AK, Vadyvaloo V. 2015. *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 survives and replicates in trophozoites and persists in cysts of *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiology Letters, 362, 2015, fnv091
11. Buse HY, Ji P, Gomez-Alvarez V. 2016. Effect of temperature and colonization of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis* on bacterial community composition of copper drinking water biofilms. Microbial Biotechnology 2017; 10(4): 773–788
12. König L, Wentrup C, Schulz F, Wascher F, Escola S, Swanson MS, Buchrieser C, Horn M. 2019. Symbiont-mediated defense against *Legionella pneumophila* in amoebae. mBio 10:e00333-19.
13. Watson J, Jenkins C, Clements A. 2018. *Shigella sonnei* does not use amoebae as protective hosts. Applied Environmental Microbiology 84:e02679-17.