

Amebas de vida libre: detección en aguas de consumo y alimentos

Trabajo de Fin de Máster

Genaro González Machín

Tutorizado por José E. Piñero Barroso y Atteneri López Arencibia.
MÁSTER UNIVERSITARIO EN SEGURIDAD Y CALIDAD DE LOS
ALIMENTOS.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
Amebas de vida libre patógenas.	3
Género <i>Acanthamoeba</i>	3
Género <i>Naegleria</i> . <i>Naegleria fowleri</i>	3
Género <i>Balamuthia</i> , <i>Balamuthia mandrillaris</i>	4
Otros géneros de amebas patógenas.	4
Objetivo.	5
Metodología: Estrategias de búsqueda de información.	6
Resultados y Discusión.....	7
Detección en aguas de consumo.	7
Muestreo.	7
Aislamiento de las Amebas.	7
Identificación.	8
Morfológica.	8
Métodos moleculares.....	9
Detección en alimentos.....	10
Discusión	11
Conclusiones.....	14
Bibliografía.....	15

Resumen

Las amebas de vida libre son organismos ampliamente distribuidos por el medio ambiente, donde podemos encontrarlos en el suelo, agua y aire. Su capacidad de formar estadios de alta resistencia denominados quistes, les permiten superar los métodos de desinfección de las aguas y provocar la contaminación de aguas de consumo y alimentos. Algunas especies de amebas de vida libre como *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* o *Sappinia diploidea* son capaces de provocar enfermedades graves como la queratitis por *Acanthamoeba*, encefalitis granulomatosa amebiana o meningoencefalitis amebiana primaria. También se han descrito amebas de vida libre capaces de actuar como vehículos para ciertas bacterias patógenas, siendo capaces de resistir a los antibióticos y suponiendo un riesgo para la Salud Pública. La importancia de las amebas de vida libre en la investigación está en auge debido al aumento de las enfermedades provocadas por las mismas, así como por la determinación de estas en nuevos hábitat y ambientes donde se creía que no podían sobrevivir. Todo ello aumenta el riesgo de exposición de los humanos a estos organismos. La detección y diferenciación de las amebas de vida libre se fundamenta tanto en métodos de observación de la morfología por microscopía como en métodos moleculares.

Palabras clave: amebas de vida libre, quistes, *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea*, detección y diferenciación y métodos moleculares.

Abstract

Free-living amoebae are organisms widely distributed throughout the environment, where they can be found in the ground, water and air. Their ability to form high resistance stages, named cysts, allowed them to overcome the water disinfection methods and to cause the pollution of drinking water and food. Some species of free-living amoebae such as *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* or *Sappinia diploidea* are able to cause serious diseases as *Acanthamoeba keratitis*, granulomatous amoebic encephalitis or primary amoebic meningoencephalitis. Free-living amoebae capable of acting as vehicles for certain pathogenic bacteria have also been described, being able to resist antibiotics and posing a problem to Public Health. The research importance of free-living amoebae is growing due to the increase in diseases caused by them, as well as the isolation of these in new habitats and reservoirs where it was believed they could not survive. All this increases the exposure risk of humans to these organisms. The detection and differentiation of free-living amoebae are based on both microscopy observation methods about the morphology and molecular methods.

Keywords: free-living amoebae, cysts, *Acanthamoeba*, *Naegleria fowlere*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea*, detection and differentiation, and molecular methods.

Introducción.

Las amebas de vida libre (AVL) son organismos unicelulares ubicuos en los ecosistemas naturales que podemos encontrar en gran cantidad en el agua, suelo o aire. Las AVL presentan un papel importante en estos ecosistemas, tanto como reductores de la biomasa bacteriana como regenerando la misma [1] [2]. A pesar del gran número de géneros y especies descritas de AVL en la naturaleza, sólo algunas especies del género *Acanthamoeba spp.*, y las especies *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*, son las que tienen mayor incidencia en las infecciones humanas [3] [4] [5] [6]. Existen otros géneros y especies tales como *Vahlkampfia spp.*, *Vermamoeba vermiformis*, *Sappinia diploidea* y *Sappinia pedata*, que también pueden causar enfermedades en humanos, aunque tienen una muy baja incidencia [3]. Desde un punto de vista epidemiológico y sanitario, el género *Acanthamoeba* y *Naegleria fowleri* son las más importantes [2].

La mayoría de AVL presentan dos estadios durante su ciclo de vida, siendo la forma de quiste la que les confiere una gran resistencia a las condiciones ambientales adversas. Estos quistes tienen una gran resistencia a los diferentes tratamientos del agua, informándose de casos de supervivencia de quistes después de procesos de clarificación, filtración rápida y ultrafiltración, así como después del tratamiento con biocidas como el cloro, el dióxido de cloro, la monocloramina, ozono, nitrato de cobre-plata y luz ultravioleta. [7] [8] [9] [10]

Las AVL se encuentran dentro de los organismos capaces de interactuar con bacterias y otros organismos. Esta asociación permite a estos endosimbiontes resistir, transmitirse y permanecer en ambientes que no son ideales para su crecimiento. Además de la protección a las condiciones ambientales externas que les confieren las AVL, estos organismos son capaces de reproducirse en el interior de estas. Asimismo, se han descrito casos de aumento de la virulencia después del paso a través de las AVL [1]. Bacterias como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli O157:H7* o *Listeria monocytogenes* han sido aisladas en el interior de AVL.

Además de bacterias, *Acanthamoeba* puede transportar en su interior virus, levaduras y otros protozoos. Se ha demostrado la capacidad de este género de albergar microorganismos como adenovirus, minivirus, poliovirus y otros [11] [12]. También se han descrito casos de asociaciones con protozoos, como *Cryptosporidium*, y con levaduras como *Cryptococcus neoformans* [13].

Amebas de vida libre patógenas.

Género *Acanthamoeba*.

El género *Acanthamoeba* está formado por protozoos oportunistas que tienen una amplia distribución en el medio ambiente [14]. Presenta dos estadios durante su ciclo de vida: la forma de trofozoíto y una forma de resistencia denominado quiste, el cual puede presentar diferentes formas dependiendo de la distribución de las puntas del endoquiste. Ambas formas de vida son infectivas y se pueden encontrar en el agua mineral, y embotellada; aguas costeras; soluciones para lentes de contacto; suelo, polvo y aire; aguas residuales; calefacción, ventilación o unidades de aire acondicionado y lavados gastrointestinales [2].

La vía de entrada en los seres humanos puede variar e ir desde la vía intranasal, permitiendo su migración directa al sistema nervioso central (SNC), a la vía cutánea, pudiendo entrar través de heridas en la piel, o por el tracto respiratorio [15]. Las amebas patógenas del género *Acanthamoeba* pueden causar infecciones oculares, queratitis por *Acanthamoeba* (AK), y encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) [2]. Las amebas del género de *Acanthamoeba* recientemente han recibido mucha atención porque pueden actuar como huéspedes para bacterias patógenas como *Legionella spp.*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia spp.*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Afipia felis* y *Escherichia coli* serotipo O157 [4].

Género *Naegleria*. *Naegleria fowleri*

El género *Naegleria* está formado por más de 30 especies que tienen una amplia distribución en el medio ambiente, siendo únicamente *Naegleria fowleri* descrita como patógena para el ser humano, a pesar de que se han descrito al menos dos especies (*Naegleria australiensis* y *Naegleria italica*) potencialmente patógenas en animales de experimentación, pero no descritas aun en humanos [4] [15]. Este organismo presenta 3 estadios durante su ciclo de vida: una forma ameboide, denominada trofozoíto ameboide, en la cual se alimenta y se divide y es la considerada forma infectante e invasiva; una forma flagelada, denominada trofozoíto flagelado, considerado un estado transitorio y una forma de resistencia o quiste, los cuales únicamente se observan en el medio ambiente.

Se ha aislado *N. fowleri* de piscinas de agua dulce, charcos, lagos, ríos, aguas termales, efluentes contaminados térmicamente de centrales eléctricas, piscinas de hidroterapia, acuarios, aguas residuales, canales de irrigación, e incluso de los fosas nasales y gargantas de individuos sanos asintomático o aguas con una cloración inadecuada que les permita proliferar y alimentarse de bacterias. Se trata de un organismo termofílico capaz de soportar temperaturas de hasta 45° C. La principal vía de infección

es mediante la entrada de estas aguas contaminadas o infectadas a través de las fosas nasales, migrando desde ahí hasta el SNC a partir de la placa cribosa, estando descrita como el agente causal de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) [4].

Género *Balamuthia*, *Balamuthia mandrillaris*.

Al igual que en el caso de *N. fowleri*, dentro del género *Balamuthia* sólo se ha descrito como agente patógeno en humanos a *Balamuthia mandrillaris*. Está presente en el suelo y, al igual que el género *Acanthamoeba*, presenta dos estadios en su ciclo de vida: la forma de trofozoíto, que se caracteriza por ser pleomórfica, y una forma de resistencia o quiste, la cual presenta una pared con tres capas. En el caso de este organismo ambos estadios son infectivos para los seres humanos

Las vías de entrada pueden ser a través de la piel por alteraciones de ésta o por vía nasal. En seres humanos se puede producir una migración vía hematogena hasta el SNC pudiendo causar, al igual que *Acanthamoeba*, EGA o lesiones cutáneas [4].

Otros géneros de amebas patógenas.

Además de las especies anteriormente descritas, existen otros géneros que se han relatado como patógenos para los humanos o que presentan gran importancia para la salud pública, ya sea por su implicación directa o por estar relacionados con la transmisión de otros organismos patógenos [7] [8].

Es el caso de algunas especies de *Sappinia spp.*, tales como *S. diploidea* o *S. pedata*. *S. diploidea* ha sido descrita como agente causal de una infección en una persona inmunocompetente de 38 años en 2001, siendo este el primer y único caso descrito en seres humanos [4]. De igual modo, se han documentado casos de queratitis donde no solo se ha aislado *Acanthamoeba*, sino que se presenta acompañada por otros géneros como *Vahlkampfia* o *Vermamoeba* [16]. Esto podría indicar la existencia de otras amebas, aparte de *Acanthamoeba*, que causan queratitis.

Objetivo.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre la detección de amebas de vida libre en aguas de consumo y alimentos.

Metodología: Estrategias de búsqueda de información.

Los estudios científicos publicados en revistas médicas fueron identificados mediante búsquedas bibliográficas en dos bases de datos distintas: “PubMed” y “ResearchGate”. Los términos de búsqueda fueron “Amebas”, “AVL”, “Acanthamoeba”, “Naegleria” “Sappinia”, “Balamuthia”, combinados con “Detección en agua”, “Detección en alimentos”, “queratitis amebiana”, “amebas de vida libre”, “encefalitis granulomatosa amebiana”. El límite establecido fue la fecha de publicación no anterior al año 1990. La identificación de estudios se completó consultando la bibliografía de los artículos seleccionados. Por último se realizó una búsqueda de páginas web para identificar posibles estudios no publicados en revistas médicas pero que hubieran sido reseñados en Internet.

De los estudios seleccionados se extrajeron los datos relativos a las características de las AVL, y a los diferentes materiales y métodos empleados para la detección de estas en aguas de consumo y alimentos.

Resultados y Discusión.

Detección en aguas de consumo.

Muestreo.

Cuando se realizan estudios de detección de AVL en aguas de consumo humano observamos como la localización del muestreo varía en función del objetivo del estudio, pueden ser muestreados directamente del agua del grifo, de plantas de tratamiento de aguas, aguas embotelladas, en ríos o sus afluentes y en zonas recreativas como piscinas. Al igual que la zona, el volumen de muestreo es variable, observándose que oscila entre un mínimo de 50ml [17] [18] [19] hasta volúmenes de más de seis litros [20]. Asimismo, se toman diferentes valores del cuerpo del agua donde se realiza el muestreo, tales como el pH o la temperatura [7] [6].

Aislamiento de las Amebas.

En la bibliografía consultada comprobamos como, una vez llega la muestra al laboratorio y previo al proceso de cultivo y crecimiento de los organismos, se realiza una filtración, aunque también hay técnicas donde se aplica cierto volumen de la muestra sobre el medio de cultivo directamente [2] [18]. En algunos casos se realiza un centrifugado de la muestra, tal y como recomienda el protocolo de Health Protection Agency [7]. En el caso de realizarse el proceso de filtración, se emplea, normalmente, un filtro de nitrocelulosa, donde el tamaño del poro varía entre valores de 0,45 μm [2] [17] [21] [22] [7] [23] y 1,2 μm [24] [6].

Una vez realizada la filtración se suelen emplean dos métodos, principalmente, para el cultivo. Por un lado, los filtros se pueden depositar directamente sobre el medio de cultivo, ya sea el filtro entero e invertido, o bien cortándolo en piezas previamente [6] [7] [24]. Por otro lado, esta membrana puede ser incubada en una solución tampón estéril, la cual en los días posteriores se centrifuga y de cada centrifugado se siembran unas pocas gotas sobre el medio de cultivo [23].

En cuanto a los medios de cultivos comúnmente utilizados, estos pueden ser solidos o líquidos. En el caso de los medios sólidos el principal medio empleado es el Agar No Nutritivo (ANN) con una suspensión de *Escherichia coli* o *E. aerogenes* inactivadas por calor, con la finalidad de servir como nutrientes para las AVL.

En el caso del medio de cultivo líquido, se emplea principalmente el medio de cultivo PYG [14] [17] [21]. Se trata de un medio de cultivo axénico, al que se le añaden antibióticos, como la penicilina o estreptomina, para evitar el crecimiento de otro tipo de organismos contaminantes de la muestra.

Uno de los métodos empleados para el aislamiento de cepas utiliza ambos tipos de medios. Primero se realiza el cultivo de la muestra en medio ANN con una suspensión de *Escherichia coli* o *E. aerogenes* inactivadas por calor y posteriormente se transfieren los fragmentos de agar que contienen los quistes a estos medios axénicos para así conseguir cepas puras y sin crecimiento de otros organismos no deseados. En algunos casos, previo al paso de un medio a otro, como método adicional para eliminar las posibles contaminaciones que puedan estar presentes en el medio de cultivo ANN, se exponen a luz UV [14].

En la bibliografía consultada también comprobamos como, en relación a la temperatura de incubación, esta varía y puede tomar diferentes valores en función de los objetivos del estudio y de las especies que se quieran identificar, así podemos encontrar estudios con temperaturas de incubación de 23°C [2], 25°C [21] [25], 30°C [23] [26], 37°C [2] [6] [7] [17] [26] y 44°C [2] [6]. La temperatura es uno de los factores que influyen de forma determinante en el crecimiento de las amebas. A pesar de que presentan un amplio rango de temperatura de crecimiento, la temperatura óptima para su crecimiento en laboratorio está entre 22°C y 37°C. El crecimiento en este rango de temperatura indica su potencial de patogenicidad, ya que demuestra su capacidad de crecimiento a la temperatura corporal humana.

Las temperaturas de incubación superiores a 44°C son empleadas para la detección de cepas virulentas de *N.fowleri*. Estas temperaturas favorecen el crecimiento de estas cepas, ya que son termófilas y dificultan el crecimiento de otras especies que puedan estar presentes.

En la bibliografía consultada también se comprobó el empleo de diferentes pruebas para detectar la posible virulencia, como la prueba de la patogenicidad in vitro, la cual estudia la termorresistencia y osmorresistencia [27], la prueba de la citotoxicidad in vitro [19] o la prueba para flagelados para *Naegleria* [5] [23] entre otros.

Esta última prueba se emplea para descartar la presencia de especies pertenecientes al género *Naegleria*. Para ello, se le añade agua destilada al medio y se realizan observaciones para examinar la transformación al estadio de trofozoíto flagelado.

Identificación.

Morfológica.

Una vez realizado el cultivo de las muestras se realizan observaciones de las placas en busca de crecimiento, normalmente, empleando microscopios invertidos y realizando esta verificación diariamente. Esta identificación se basa en observar las diferentes

características morfológicas, tales como las formas de los seudópodos, la forma de los trofozoítos o de los quistes o su tamaño o tolerancia a la temperatura [9]. Estas identificaciones se realizan empleando diferentes claves de identificación [24] [28] [29].

Para conseguir cepas puras de estas AVL se realiza un traspaso de las AVL identificadas en el medio a una nueva placa, removiendo el fragmento de medio donde se encuentran en la primera placa y transfiriéndolo al nuevo medio [28].

Métodos moleculares.

Extracción y aislamiento del ADN y análisis PCR

Una vez realizado los procesos de purificación de las AVL, y para llevar a cabo la extracción del ADN, se obtienen las amebas del medio y se usa para ello una solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS), a pH 7,2-7,5. En cuanto a la extracción y purificación del ADN, este se realiza, principalmente, mediante el uso de kits tales como NucleoSpin® Tissue Kit [2], QIAamp DNA Mini Kit [22] [30], QIAamp DNA Blood Mini Kit [19].

En cuanto al análisis por PCR, las técnicas empleadas pueden detectar diferentes marcadores genéricos: Aca 16S, Ac6/210, GP, JDP [22], Internal transcribed spacer (ITS) [19] [24] [28] entre otras. El análisis de la variación en la secuencia ribosomal ITS se ha descrito como una prueba muy efectiva para diferenciar entre géneros diferentes y, también, para diferenciar dentro de un mismo género [31]. Las técnicas de diagnóstico molecular que analizan la región 18S de ADNr son de gran utilidad en la identificación de diferencias dentro del propio género [2].

En cuanto a los cebadores específicos para realizar las técnicas de PCR, se emplean diferentes tipos: JDP1 y JDP2 para el género *Acanthamoeba* específicos para la región 18S ADNr definida como ASA.S1 [30]. En el caso de *Naegleria floweri*, p3f/p3r específico para la secuencia cromosomal del ADN [29], ITS/ITS2 para el caso de *Vahlkampfia*; 5'Balspec16S y 3'Balspec16S, que amplifican una porción de la región 16S del ADNr de la mitocondria, en el caso de *B. madrillaris*, BNgenR2/BNgenF1 para *Sappinia* y la pareja NA1/NA2 en el caso de *Vermamoeba*.

Detección en alimentos

La detección de AVL en alimentos se diferencia con respecto a la detección en agua en la forma de recuperación de AVL en las muestras. No existen métodos estandarizados exclusivos para las AVL, por lo que en la mayoría de las investigaciones se emplean técnicas para la recuperación de protozoos de vida libre, o técnicas de recuperación de protozoos en heces. Uno de los métodos empleados es el de filtración que es el mismo que se comentó anteriormente en la detección de AVL en agua.

Otro método que se emplea es el de sedimentación que se basa en la determinación de las AVL que se recogen en el sedimento obtenido tras aplicar estas técnicas, mientras que los flagelados y ciliados se mantienen en la parte del sobrenadante. De este modo, se realiza inoculaciones del sobrenadante y del sedimento en dos placas separadas de Agar No Nutritivo con una suspensión de *Escherichia coli* o *E. aerogenes* inactivadas por calor. También se emplean otros tipos de técnicas de sedimentación como la técnica de Formalina – Acetato de etilo.

Discusión

Las amebas de vida libre están ampliamente distribuidas por el ambiente, tanto en el aire, como en el suelo y el agua. Esto deriva en contaminación tanto de agua como de alimentos por AVL. A pesar de que solo un pequeño grupo de estas son patógenas para el ser humano, la severidad de las patologías producidas es elevada y se ha visto en auge en los últimos años [18]. Las investigaciones de AVL, sobre todo en aguas, se han visto incrementadas debido a la ubicuidad de éstas, así como a su patogenicidad sobre los humanos o a su capacidad de interactuar con otro tipo de organismos, como bacterias, y actuar como vehículos de transporte de estas.

Varios estudios han descrito la presencia de AVL tanto en plantas de tratamientos de aguas como en las redes de distribución de estas a la población, o incluso en aguas embotelladas [9] [25] [32] [33]. Esto evidencia, por un lado, una ineficiente aplicación de los métodos de filtración y eliminación de microorganismo de las aguas de consumo. Por otro lado, este hecho pone de manifiesto la gran resistencia que poseen las AVL, a través de sus estadios vegetativos de resistencia, a los diferentes métodos de desinfección de aguas [25].

Asimismo, la presencia de AVL en aguas tanto de consumo como de uso agrario o recreativo aumenta la posibilidad de infección de animales o alimentos, siendo esta otra vía de entrada de las mismas a la cadena alimentaria [18].

El aumento de investigaciones sobre la detección de AVL en nuevos ambientes, donde no se creía que pudieran desarrollarse [34], su supervivencia a las plantas de tratamiento de aguas y su ubicuidad en el medio ambiente, hace plantear la necesidad de hacer más hincapié en las investigaciones sobre los posibles nichos y ecosistemas donde estas se pueden encontrar y que puedan ser foco de infecciones para animales o humanos [35].

Habría que resaltar que los estudios de AVL en alimentos son escasos, pues la transmisión de AVL por esta vía está aún cuestionada y faltan investigaciones sobre las diferentes relaciones e interacciones entre ambos. A pesar de ello, existen evidencias de que la contaminación de alimentos por AVL existe, pues se han detectado en diversos alimentos como frutas y verduras [4] [36] [37] [38] o en alimentos de origen animal, como por ejemplo peces o cerdos [1] [34]. En la actualidad no hay métodos estandarizados para la detección de AVL en alimentos.

Esta falta de consenso a la hora de elegir un método común para la detección de AVL, tanto en alimentos como en aguas de consumo, puede ser el causante de las disparidades de resultados que existen entre algunas investigaciones y autores [8].

Es importante recalcar, también, que falta una legislación aplicable exclusiva para AVL. Para el caso de aguas, la legislación existente se refiere a la determinación de indicadores de bacterias fecales (Directiva 98/83/CE). En el caso de España solo hay legislación aplicable a parásitos en aguas para la detección de *Cryptosporidium* (Real Decreto 140/2003) [20]. A pesar de esto, hay países como México, con la norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, donde se establece como límite permisible la ausencia de estas en la muestra en agua de consumo y recreo, para los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* y Australia con la “Australian Drinking Water Guidelines”, documento empleado ampliamente en Australia para la gestión del agua potable, donde exponen que a pesar de no haber un límite establecido para estos organismo, una densidad de 2 organismos por litro (o detección en una muestra de 500 ml) es un umbral apropiado para realizar las correspondientes acciones sobre estas aguas.

Dado su ubicuidad, las AVL han sido detectadas en gran parte del mundo. Estudios en España en ríos, plantas de tratamiento de agua y plantas de aguas residuales han detectado la presencia de AVL en un 94,6% de las muestras (221/223) [20].

Estudios en las Islas Canarias han dado resultados positivos tanto en muestras de tierra y arena de playa, 43/114 para el caso de tierra y 21/50 muestras positivas para el caso de arena de playa, como en muestras de agua de consumo y agua de mar, con porcentajes del 59,46% (88/148) y 40% (24/60) respectivamente, para *Acanthamoeba* [21].

En Túnez estudios de las aguas en hospitales dio como resultado valores positivos para AVL en un 53,5%, encontrándose *Acanthamoeba* en un 47,6% (40/84) de las muestras [39].

Estudios realizados en aguas termales de 13 provincias de Tailandia detectaron la presencia de AVL en un 38,2% (26/68) de las muestras, donde se detectó *Naegleria* en un 35,3% (24/68) y *Acanthamoeba* en un 13,2% (9/68) de las muestras [40]. Estudios en diferentes países del sureste de Asia detectaron la presencia de AVL tanto en aguas tratadas como en aguas sin tratar, en Singapur con un 43% (9/21) de muestras positivas, en Laos un 87% (27/31) de las muestras y en Birmania en un 92% (39/42) [18].

En USA también se han identificado AVL, estudios en ríos de Virginia se han obtenido valores positivos en AVL del 43,4% (143/330) para diferentes géneros de amebas como *Naegleria*, *Vannella*, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, y *Hartmannella* [41].

En Brasil, al igual que en Túnez, se han detectado AVL en aguas de hospitales, obteniendo hasta un 45,5% de muestras positivas para *Acanthamoeba* y un 3,8% para el género *Naegleria* de 132 muestras totales [42]. Asimismo, en este mismo país se han detectado genotipos específicos de *Acanthamoeba* en ostras y aguas de estuarios [43].

Una de las mayores problemáticas que se encuentra en los estudios de AVL son los métodos de identificación de las mismas. La observación de los estadios morfológicos es uno de los más utilizados, pudiendo llevarse a cabo una diferenciación a nivel de género. No se puede emplear únicamente este método para realizar la diferenciación, pues se ha observado que cambios en los medios y técnicas de siembra influyen en el tamaño y morfología de las AVL [2]. La clasificación de las AVL en base únicamente a los criterios morfológicos se considera insuficiente y necesita de la complementación de los diferentes métodos moleculares, tales como el análisis de la variación en la secuencia ribosomal ITS o las técnicas de diagnóstico molecular que analizan la región 18S de ADNr entre otras [2] [31].

Es evidente que se necesitan avances en la metodología de detección e identificación de AVL y que esto ayudaría en el diagnóstico rápido de enfermedades provocadas por estos organismos y permitiría estudios con gran cantidad de muestras.

Estas metodologías de detección deberían ser más rápidas, obteniendo el ADN directamente de la muestra, sin necesidad de un cultivo previo. Esto podría ser eficaz para el caso del género *Balamuthia*, pues no crece fácilmente en el medio convencional de ANN.

Habría que considerar también el empleo de diferentes técnicas de PCR, como la PCR anidada, la cual brinda una mayor sensibilidad y especificidad, o el uso de la PCR a tiempo real en lugar de la PCR convencional.

El aumento en el conocimiento sobre el genoma de las diferentes especies de AVL brindaría, asimismo, mejoras en la diferenciación y determinación de la patogenicidad de estos organismos.

Conclusiones

1. En la actualidad no hay métodos estandarizados para la detección de AVL en alimentos o aguas.
2. No existe legislación alguna sobre la presencia de amebas de vida libre en aguas de consumo o alimentos en España. Aunque si existe legislación aplicable a AVL en países como México y Australia.
3. Existe contaminación de alimentos por AVL, pues se han detectado en alimentos como frutas y verduras.
4. Se han detectado AVL en aguas, tanto de consumo humano como de uso agrario y recreativo.
5. Se requiere una mejora de los métodos específicos de aislamiento y detección de AVL tanto en aguas de consumo humano como en alimentos.

Bibliografía

- [1] Vaerewijck, M., Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K., Houf, K., «Interactions of Foodborne Pathogens with Free-living Protozoa: Potential Consequences for Food Safety,» *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, nº 5, p. 924–944, 2014.
- [2] Nagyová, V., Nagy, A., Janeček, Š., Timko, J., «Morphological, physiological, molecular and phylogenetic characterization of new environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from the region of Bratislava, Slovakia,» *Biologia*, vol. 65, nº 1, pp. 81-91, 2010.
- [3] Javanmard, E., Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Lasjerdi, Z., Behniafar, H., Mirjalali, H., «Molecular identification of waterborne free living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran,» *Experimental Parasitology*, vol. 183, pp. 240-244, 2017.
- [4] Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., «Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*,» *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 50, nº 1, pp. 1-26, 2007.
- [5] Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah, A., LaPat-Polasko, L., «Identification of *Naegleria fowleri* in Domestic Water Sources by Nested PCR,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, nº 10, pp. 5864-5869, 2003.
- [6] Farra, A., Bekondi, C., Tricou, V., Mbecko, J.R., Talarimi, A., «Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: epidemiological and molecular aspects,» *The Pan African Medical Journal*, pp. 26-57, 2017.
- [7] Muchesa, P., Mwamba, O., Barnard, T.G., Bartie, C., «Detection of Free-Living Amoebae Using Amoebal Enrichment in a Wastewater Treatment Plant of Gauteng Province, South Africa,» *BioMed Research International*, 2014.

- [8] Loret, JF., Greub, G., «Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment,» *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 213, n° 3, pp. 167-175, 2010.
- [9] Thomas, V., Loret, JF., Jousset, M., Greub, G., «Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant» *Environmental Microbiology*, vol. 10, n° 10, pp. 2728-2745, 2008.
- [10] Valster, RM., Wullings, BA., van der Kooij, D., «Detection of Protozoan Hosts for *Legionella pneumophila* in Engineered Water Systems by Using a Biofilm Batch Test,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n° 21, pp. 7144-7153, 2010.
- [11] Lorenzo-Morales, J., Coronado-Álvarez, N., Martínez-Carretero, E., Maciver, SK., Valladares, B., «Detection of Four Adenovirus Serotypes within Water-Isolated Strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain,» *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, n° 4, p. 753–756, 2007.
- [12] Siddiqui, R., Khan, NA., «Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*,» *Parasites and Vectors*, vol. 5, n° 6, 2012.
- [13] Derengowski, LS., Paes, HC., Albuquerque, P., Tavares, AH., Fernandes, L., Silva-Pereira, I., Casadevall, A., «The Transcriptional Response of *Cryptococcus neoformans* to Ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and Macrophages Provides Insights into the Evolutionary Adaptation to the Mammalian Host,» *Eukaryotic Cell*, vol. 12, n° 5, pp. 761-774, 2013.
- [14] N. Ahmed Khan, «*Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health,» *FEMS microbiology reviews*, vol. 30, n° 4, pp. 564-595, 2006.
- [15] F. L. Schuster, «Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas,» *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, n° 3, pp. 342-354, 2002.

- [16] Niyiyati, M., Lasgerdi, Z., Lorenzo-Morales, J., «Detection and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae from Water Sources in Kish Island, Southern Iran,» *Microbiology Insights*, pp. 1-6, 2015.
- [17] Magliano, A., Maia da Silva, F., Teixeira, M., Alfieri, SC, «Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil,» *Experimental Parasitology*, vol. 123, n° 3, pp. 231-235, 2009.
- [18] Abdul Majid, MA., Mahboob, T., Mong, BGJ., Jaturas, N., Richard, RL., Tian-Chye, T., Phimpila, A., Mahaphonh, P., Aye, K., Aung, W., Chuah, J., Ziegler, A., Yasiri, A., Sawangjaroen, N., Lim, Y., Nissapatorn, V., «Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries,» *PLoS ONE*, vol. 12, n° 2, 2017.
- [19] Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Ben Nour, N., Füchslin, HP., Schürch, N., Gottstein, B., Müller, N., «Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae,» *Research in Microbiology*, vol. 160, n° 6, pp. 367-374, 2009.
- [20] 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 Research*, vol. 47, n° 19, pp. 6966-6972, 2013.
- [21] Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E., Valladares, B., «Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources,» *Parasitology Research*, vol. 95, n° 4, pp. 273-277, 2005.
- [22] Derda, M., Wojtkowiak-Giera, A., Hadas, W., «Comparative analyses of different genetic markers for the detection of *Acanthamoeba* spp. isolates,» *Acta parasitologica*, vol. 59, n° 3, pp. 472-477, 2014.

- [23] CoGkun, KA., Özçelik, S., Tutar, L., ElaldJ, N., Tutar, Y., «Isolation and Identification of Free-Living Amoebae from Tap Water in Sivas, Turkey,» *BioMed Research International*, 2013.
- [24] Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusuhara, Y., Karanis, P., «Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba and Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan,» *Parasitology Research*, vol. 105, n° 4, p. 1109–1117, 2009.
- [25] Saburi, E., Rajaii, T., Behdari, A., Hasan-Kohansal, M., Vazini, H., «Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic review,» *Journal of Parasitic Diseases*, vol. 41, n° 4, pp. 919-928, 2017.
- [26] Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchard, Y., «Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water,» *Water Research*, vol. 47, n° 19, pp. 6958-6965, 2013.
- [27] Behnia, M., Hatam-Nahavandi, K., Hajjalilo, E., Niiyyati, M., Tarighi, F., Bakhtiar Akram, A., Salimi, M., Rezaeian, M., «Occurrence of Acanthamoeba Genotypes in Wastewater Samples in Tehran, Iran,» *Iraina Journal of Parasitology*, vol. 12, n° 4, pp. 516-521, 2017.
- [28] 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,» *Environmental Science & Technology*, vol. 47, n° 7, pp. 3132-3140, 2013.
- [29] 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 Research*, vol. 92, n° 5, pp. 405-413, 2004.
- [30] Montalbano Di Filippo, M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso, R., Berrilli, F., Di Cave, D., «Isolation and Molecular Characterization of Free-Living Amoebae from Different Water Sources

in Italy,» *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 12, n° 4, pp. 3417-3427, 2015.

- [31] Montalbano Di Filippo, M., Novelletto, A., Di Cave, D., Berrilli, F., «Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp. from geothermal springs in Italy,» *Experimental Parasitology*, vol. 183, pp. 143-149, 2017.
- [32] Corsaro, D., Saucedo Pages, G., Catalan, V., Loret, JF., Greub, G., «Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants,» *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 213, n° 3, pp. 158-166, 2010.
- [33] Özçelik, S., Coşkun, KA., Yünlü, Ö., Alim, A., Malatyalı, E., «The Prevalence, Isolation and Morphotyping of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from Tap Water and Environmental Water Sources in Sivas,» *Turkiye Parazitolojisi Dergisi*, vol. 36, n° 4, pp. 198-203, 2012.
- [34] Chavatte, N., Lambrecht, E., Van Damme, I., Sabbe, K., Houf, K., «Free-living protozoa in the gastrointestinal tract and feces of pigs: Exploration of an unknown world and towards a protocol for the recovery of free-living protozoa,» *Veterinary Parasitology*, vol. 225, pp. 91-98, 2016.
- [35] Armand, B., Motazedian, MH., Asgari, Q., «Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods,» *Parasitol Research*, vol. 115, n° 1, pp. 63-68, 2016.
- [36] Vaerewijck, M., Sabbe K., Baré, J., Houf, K., «Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 147, n° 2, pp. 105-111, 2011.
- [37] Robertson, LJ., Gjerde, G., «Isolation and Enumeration of *Giardia* Cysts, *Cryptosporidium* Oocysts, and *Ascaris* Eggs from Fruits and Vegetables,» *Journal of Food Protection*, vol. 63, n° 6, pp. 775-778, 2000.

- [38] Shukla, K., Sharma, AK., «First report of amphizoic amoebae isolated from edible oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju* (Singer, 1949),» *Journal of Applied and Natural Science*, vol. 3, n° 2, pp. 253-257, 2011.
- [39] Trabels, H., Dendana, F., Neji, S., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Makni, F., Ayadi, A., «Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia,» *Parasitology Research*, vol. 115, n° 1, p. 431–435, 2016.
- [40] Lekkla, A., Sutthikornchai, C., Bovornkitti, S., Sukthana, Y., «Free-living amoeba contamination in natural hot springs in Thailand.,» *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, vol. 36, pp. 5-9, 2005.
- [41] Ettinger, MR., Webb, SR., Harris, SA., McIninch, SP., Garman, GC., Brown, BL., «Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA,» *Parasitology Research*, vol. 89, n° 1, pp. 6-15, 2002.
- [42] Silva, MA., Rosa, JA., «Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais.,» *Saúde Pública*, vol. 37, n° 2, pp. 42-246, 2003.
- [43] Leal, DAG., Souza, DSM., Caumo, KS., Fongaro, G., Panatieri, LF., Durigan, M., Rott, MB., Barardi, CRM., Franco, RMB., «Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil.,» *Water Research*, pp. 273-280, 2018.
- [44] Lu J, Struewing I, Vereen E, Kirby AE, Levy K, Moe C, Ashbolt N., «Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system.,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 120, n° 2, pp. 509-521, 2016.
- [45] Amorós, I., Alonso, JL., Cuesta, G., «*Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts on Salad Products Irrigated with Contaminated Water,» *Journal of Food Protection*, vol. 73, n° 6, pp. 1138-1140, 2010.

- [46] Smith, HV., Cacciò, SM., Cook, N., Nichols, RA., Tait, A., «Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses,» *Veterinary Parasitology*, vol. 149, n° 1-2, pp. 29-40, 2007.
- [47] Cook, N., Paton, CA., Wilkinson, N., Nichols, RA., Barker, K., Smith, HV., «Towards standard methods for the detection of Cryptosporidium parvum on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 109, n° 3, pp. 215-221, 2006.
- [48] J. D. Jonckheere, «Isolation and molecular identification of vahlkampfiid amoebae from an island (Tenerife, Spain),» *Acta protozoologic*, vol. 45, n° 1, pp. 91-96, 2006.
- [49] Schuster, FL., Honarmand, S., Visvesvara, GS., Glaser, CA., «Detection of Antibodies against Free-Living Amoebae Balamuthia mandrillaris and Acanthamoeba Species in a Population of Patients with Encephalitis,» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, n° 9, p. 1260–1265, 2006.