
Aislamiento, e identificación de Amebas de Vida Libre de unidades dentales y aires acondicionados de una Clínica Odontológica. Fase II

Castillo Mabel

Universidad de Panamá, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina
mabelcastillo10@gmail.com

Gómez Tania

Universidad de Panamá, Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina
taniagomez1201@gmail.com

Ying Argentina

Universidad de Panamá, Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina
yingargentina@gmail.com

Abstract

Free-living amoebas (AVL) are protozoans with a wide environmental distribution, reported mainly in water, soil, ducts and biofilms. Some species of the genera *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* and *Sappinia* are amphizoic and can cause pathologies such as primary amoebic meningoencephalitis (PAM), amoebic granular encephalitis (GAE), and amoebic keratitis in humans and animals. Even though cases of infection with pathogenic AVL are of very low frequency or low morbidity, their high mortality represents a potential risk in environments in which there are clinical interventions with invasive processes, or immunocompromised patients. The presence of AVL is expected in any humid environment, however, it is important to determine if they represent a risk to human health. In a previous study, AVL were isolated in dental units and air conditioners of a dental clinic, which were only identified morphologically in the genus *Acanthamoeba*. These amoebas were kept in the stock collection of the Department of Microbiology of the Faculty of Medicine. In phase II of the study, the molecular and physical-chemical identification of the free-living amoebas that were kept in the stock collection of the Department of Human Microbiology was carried out. During the pandemic and the determination of the levels of osmotolerance and thermotolerance they presented. Molecularly, the AVL of the strain corresponded to the genus *Acanthamoeba*. The four strains were thermotolerant and not osmotolerant. This study represents the first report of the presence of free-living amoebas in dental units and air conditioners in Panama.

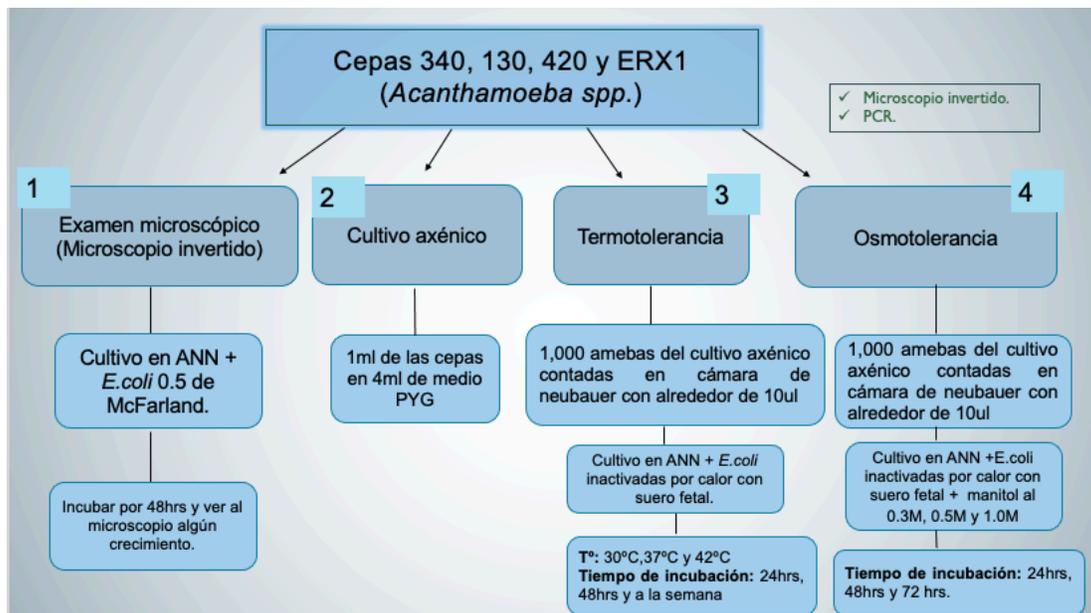
Keywords: Free-living amoebas, osmotolerance, thermotolerance

Resumen

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos de amplia distribución ambiental, reportados principalmente en agua, suelos, ductos y biofilms. Algunas especies de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*, son anfizoicas y pueden causar patologías como la meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), Encefalitis granulosa amebiana (EGA), y queratitis amebiana en humanos y animales. Aún cuando los casos de infección con AVL patógenas son de muy baja frecuencia o baja morbilidad, su alta mortalidad representa un riesgo potencial en ambientes en los que hay intervenciones clínicas con procesos invasivos, o pacientes inmunocomprometidos. La presencia de AVL se espera en cualquier ambiente húmedo, sin embargo, es importante determinar si representan un riesgo para la salud humana. En un estudio previo se aislaron AVL en unidades dentales y aires acondicionados de una clínica odontológica, que solo fueron identificadas morfológicamente en el género *Acanthamoeba*. Estas amebas se mantuvieron en el cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina. En la fase II del estudio se procedió a la identificación molecular y físico química de las amebas de vida libre que se mantuvieron en el cepario del departamento de Microbiología Humana durante la pandemia y a la determinación de los niveles de osmotolerancia y termotolerancia que presentaban. Molecularmente las AVL del cepario correspondieron al género *Acanthamoeba*. Las cuatro cepas fueron termotolerantes y no osmotolerantes. Este estudio representa el primer reporte de la presencia de amebas de vida libre en unidades dentales y aires acondicionados en Panamá.

Palabras claves: amebas de vida libre, osmotolerantes, termotolerante.

MATERIALES Y MÉTODOS



A Cuatro cepas identificadas morfológicamente dentro del género de *Acanthamoeba* (340, 130, 420 y ERX1) en la fase I, se le hicieron pruebas de termotolerancia y osmotolerancia y a dos cepas identificadas morfológicamente como género *Acanthamoeba* se les hizo PCR y secuenciación.

Examen microscópico

Se utilizó un microscopio invertido para la observación de AVL de los cultivos tanto de ANN como de los cultivos para la termotolerancia y osmotolerancia. Se tomó como referencia la forma y tamaño de quistes, características de endoquiste y apariencia de trofozoítos de acuerdo a la clave de Page (1976).

Cultivo axénico

Las muestras aisladas y los pases de cepas conocidas fueron cultivadas en ANN suplementados con cepa 35218 de *Escherichia coli* al 0.5 de McFarland, se incubaron 48 horas a temperatura ambiente, luego donde se observaron crecimiento amebiano, se transfirió a un medio axénico con aproximadamente 5mL de medio de crecimiento PYG, compuesto por peptona, extracto de levadura y glucosa.

Termotolerancia

En placas de agar no nutritivo suplementadas con cepa 35218 de *Escherichia coli* inactivadas por calor con suero fetal, se colocó un inóculo de aproximadamente 1000 amebas que

fueron contadas en cámara de Neubauer con 10ul de cada cepa. Las placas se incubaron a 30°C, 37°C y 42°C realizando revisiones de 24, 48 horas y una semana mediante el uso de un microscopio invertido. Como control se utilizó una placa de ANN bajo las mismas condiciones descritas previamente y se incubó a temperatura ambiente.

Finalizado el tiempo de incubación, el crecimiento final se evaluó cualitativamente, mediante la observación de la presencia tanto de trofozoítos como de quistes, registrándolo como +/- (presencia de quistes positiva o negativa), +/- (presencia de trofozoítos positiva o negativa) e interpretando el crecimiento abundante como +++, el moderado como ++, y el nulo -. Luego que se cumplió el tiempo, se tomó en cuenta lo siguiente: la observación de la presencia de trofozoítos al igual que su multiplicación, presencia de una vacuola pulsátil activa y la distribución fuera del punto de inoculación inicial en toda la placa de ANN.

Osmotolerancia

Para el estudio de la osmotolerancia se utilizaron placas de ANN con manitol en concentraciones de 0.3M, 0.5M y 1.0M suplementadas con *Escherichia coli* inactivadas por calor con suero fetal. En el medio de las placas se inocularon aproximadamente 1000 amebas contadas en cámara de Neubauer con 10ul de cada cepa. Todas las placas se realizaron por triplicado. Como control se emplearon placas de ANN sin manitol bajo las mismas condiciones. Para confirmar la presencia y crecimiento de las amebas en las placas se utilizó el microscopio invertido transcurridos 24, 48 y 72 horas.

Se consideró como resultado positivo la observación de un diámetro superior a unos 5mm del punto de inoculación inicial.

Extracción de ADN.

Se trabajaron dos cepas de un estudio anterior a la cual ya le habían realizado las pruebas fisicoquímicas, para ello se utilizó una prueba comercial que consiste en unir el ADN a una membrana de gel de sílice (kit comercial *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del ADN de AVL después de un lavado con 2ml de solución salina, se recogió la suspensión en tubo eppendorf de 1.5ml, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se volvió a resuspender en 500ul con solución salina para la posterior extracción de ADN.

Secuenciación

Los amplicones purificados empleados en el PCR se secuenciaron por la casa comercial MacroGen en la sede Corea del Sur.

Para el análisis de datos, se utilizó el software SnapGene, la base de datos NCBI, Blastn y Clustal OMEGA.

RESULTADOS

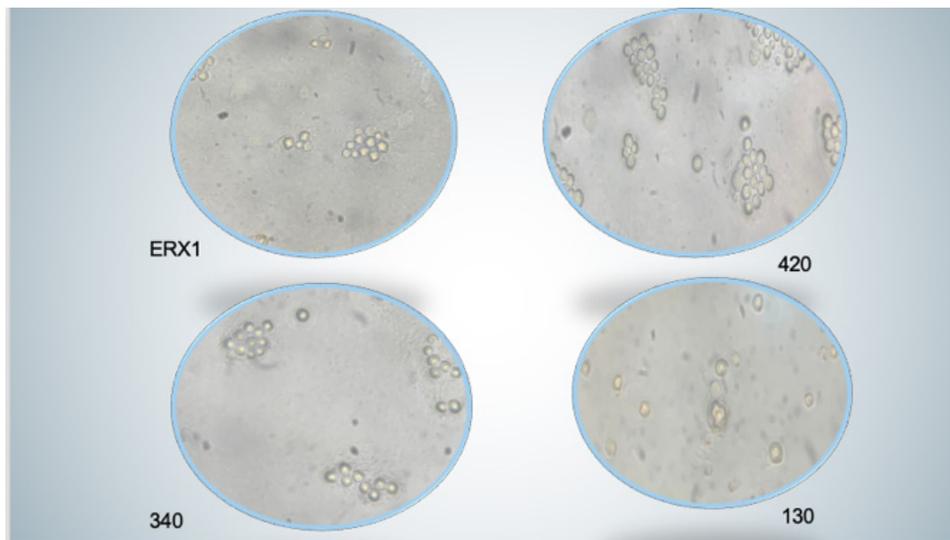
Las cuatro cepas obtuvieron un crecimiento amebiano a temperaturas de 37°C y 42°C, la cepa 130 y ERX1 a las 24 horas, y las cepas 340 y 420 con un crecimiento a la semana.

RESULTADOS

TERMOTOLERANCIA

+: Positivo
- : Negativo
Crecimiento:
- Moderado: ++
- Abundante: +++

		TERMOTOLERANCIA			
		30°C	37°C	42°C	
130	24 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	-	+
		Crecimiento	-	-	++
	48 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	+	+
		Crecimiento	-	+++	+++
	1 ^{ra} semana	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	+	++	++
		Crecimiento	+++	+++	+++
420	24 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	-	-
		Crecimiento	-	-	-
	48 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	-	-
		Crecimiento	-	-	-
	1 ^{ra} semana	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	+	+
		Crecimiento	-	+++	+++
ERX1	24 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	+	-
		Crecimiento	-	++	-
	48 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	+	-
		Crecimiento	-	+++	-
	1 ^{ra} semana	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	+	+	-
		Crecimiento	+++	+++	+++
340	24 horas	Trofozoitos	-	-	-
		Quistes	-	-	-
		Crecimiento	-	-	-
	48 horas	Trofozoitos	+	-	-
		Quistes	-	+	+
		Crecimiento	-	++	+
	1 ^{ra} semana	Trofozoitos	+	+	-
		Quistes	+	+	-
		Crecimiento	+++	++	+++

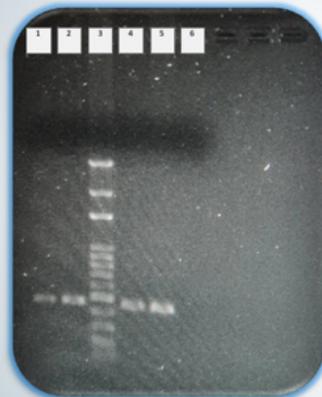


OSMOTOLERANCIA

Positivo: Diámetro superior a los 5mm desde el punto de inoculación en el plato de agar.

RESULTADOS DE OSMOTOLERANCIA				
Cepa	Concentración Manitol	24 horas	48 horas	72 horas
130	1,0M	3,5mm	✓ 6mm	✓ 10mm
	0,5M	3mm	3mm	3mm
340	1,0M	5,5mm	✓ 8mm	✓ 10mm
	0,5M	5mm	5mm	5mm
ERXI	1,0M	5mm	✓ 8mm	✓ 13mm
	0,5M	3mm	5mm	5mm

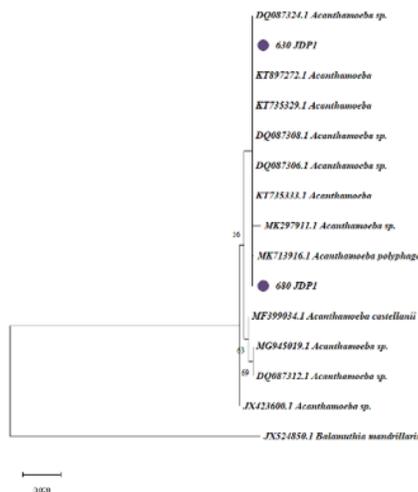
ELECTROFORESIS EN GEL

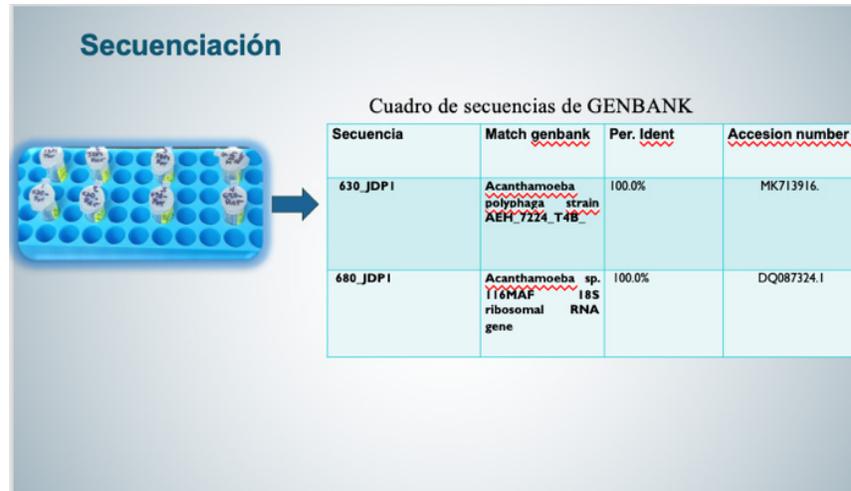


Representación de los productos esperados de la PCR convencional del gen de *Acanthamoeba* spp. en gel de agarosa para electroforesis. **Carril 1 y 2:** Cepa 680, **carril 3:** marcador de peso molecular, **carril 4 y 5:** cepa 630 y **carril 6:** control negativo. Productos observados alrededor de los 500pb.

Análisis filogenético

- Método utilizado: Maximum Likelihood (Método de caracteres)
- modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I)





CONCLUSIONES

El crecimiento de las cuatro cepas a distintas concentraciones de osmolaridad y a temperaturas mayores de los 35°C, sugiere un posible potencial patogénico de las amebas del género *Acanthamoeba*, encontradas.

Las cuatro cepas trabajadas no tuvieron crecimiento en concentración de 3.0M.

La identificación molecular por PCR a las cepas 680 y 630 confirmó la presencia de amebas del género *Acanthamoeba*.

REFERENCIAS

- [1] Astorga, B. 2016. Ecología de *Acanthamoeba* spp. en Chile: Identificación fenotípica y genotípica en agua, suelos y vegetales.
- [2] Castro, E. 2015. Determinación de características asociadas al potencial patogénico de aislamientos de *Acanthamoeba*, obtenidos a partir de muestras de equipos de la Universidad de Costa Rica. 7-74.
- [3] Costamagna, S. 2021. *Acanthamoeba* spp.: Ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre.
- [4] Dávila, A. 2014. Epidemiología y diagnóstico de amebas de vida libre implicadas en salud humana. 1-184.
- [5] Fernández, M. 2015. Caracterización molecular de amebas de vida libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: Asociación con otros microorganismos y riesgos para salud pública.
- [6] Fernández, S; Gutiérrez, E. 2020. Aislamiento y caracterización morfológica de amebas de vida libre en unidades dentales y unidades de aires acondicionados de una clínica odontológica practico-docente del centro de la ciudad de Panamá. 2-59.
- [7] Khan, N. 2006. *Acanthamoeba*: biología y creciente importancia en la salud humana. *Oxford Academic*, 30(4), 564-595. <https://academic.oup.com/femsre/article/30/4/564/2367614?login=false>
- [8] Król-Turmińska, K; & Olender, A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2), 254-260.

- [9] Laconte, M; Rivero, F; & Lujan, H. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de amebas de vida libre (*Acanthamoeba*) obtenidas del medio ambiente y de pacientes con queratitis amebiana.
- [10] Mercedes, C. 2017. Aislamiento y caracterización molecular de amebas de vida libre en Venezuela.
- [11] Oddó, D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómoclínicos. 23(3) 200-214.
- [12] Pereira, A; Pérez, M. 2003. Amebas de vida libre. *Elsevier*, 22(6) 114-117.
- [13] Rojas, M; Rodríguez, M; & García, F. 2017. Presencia de *Acanthamoeba spp.* en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 227-234.
- [14] Rojas, C.2021. Enfermedades por amebas de vida libre. 6(9).
- [15] Visvesvara, G. S. (2013). Infections with free-living amebae. In Handbook of clinical neurology (1st ed; vol.114, Issue c).

AUTORIZACIÓN Y LICENCIA CC

Los autores autorizan a APANAC XIX a publicar el artículo en las actas de la conferencia en Acceso Abierto (Open Access) en diversos formatos digitales (PDF, HTML, EPUB) e integrarlos en diversas plataformas online como repositorios y bases de datos bajo la licencia CC:

Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

Ni APANAC XIX ni los editores son responsables ni del contenido ni de las implicaciones de lo expresado en el artículo.