



Free-living amoebae detection by culture in superficial water sources in the city of Reynosa, Tamaulipas

Detección por cultivo de amibas de vida libre en fuentes de agua superficiales de la Cd. de Reynosa, Tamaulipas

Omar Alejandro Cabrero-Martínez¹, José Prisco Palma Nicolás², Ana Verónica Martínez-Vázquez¹, Gildardo Rivera Sánchez¹, Virgilio Bocanegra-García^{1*}

¹Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, Tamaulipas, México.

²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México.

*Corresponding author.

E-mail address: vbocanegg@yahoo.com; vbocanegra@ipn.mx (V. Bocanegra-García).

Article history:

Received: 30 December 2017 / Received in revised form: 16 March 2018 / Accepted: 18 March 2018 / Published online: 1 April 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.2.16>

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are widely distributed protozoa in the environment which has been isolated from a variety of sources including, water, soil and, dust, although diseases caused by them are considered neglected waterborne pathogens due to the lack of research concerning them. Among these organisms, *Acanthamoeba* spp. and *Naegleria fowleri*, the ones of interest for the present study, are reported to be pathogenic and opportunistic agents of severe pathologies. Furthermore, these organisms act as “Trojan horses” for pathogenic bacteria, fungi and viruses resistant to its’ phagocytosis, which represents a threat to public health due to the resistance of these protozoans to inactivation methods. Currently, there is no available data about their distribution in environmental sources in the state of Tamaulipas, thus the aim of this study was to evaluate the presence of these organisms in the City of Reynosa, Tamaulipas using microbiological culture methods. Their identification is based on morphological features observed with light microscopy and the sampling places are evaluated to determine the biological diversity and presence of

other organisms due to the observed elevated levels of pollution. The results revealed that 50% of the assessed sampled places were positive for the presence of *Acanthamoeba* spp.

Keywords: *Acanthamoeba* spp., Free-living Amoebae, *Naegleria fowleri*, Prevalence.

RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoarios ampliamente distribuidos en el ambiente, aislados de una variedad de fuentes, incluyendo agua, suelo y polvo. Son considerados como patógenos desatendidos transmitidos por el agua, por su falta de estudio. Entre estos, *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri*, las de interés para el presente estudio, son conocidas como agentes patogénicos y oportunistas de patologías severas. Más allá, estos organismos funcionan como “Caballo de Troya” para otras bacterias, hongos y virus patógenos para el humano, resistentes a su fagocitosis, lo cual representa un riesgo sanitario por su conocida resistencia a métodos de inactivación en agua. Actualmente, no existe información acerca de su distribución ambiental en el estado de Tamaulipas, es por ello por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de ellas mediante métodos de cultivo microbiológico. Su identificación se realizó a partir de características físicas observadas mediante inspección microscópica y los puntos de muestreo fueron evaluados para determinar la diversidad biológica y la presencia de otros organismos, debido a los altos niveles de contaminación observados. Los resultados revelaron que un 50% de los lugares muestreados fueron positivos para la presencia de *Acanthamoeba* spp.

Palabras clave: *Acanthamoeba* spp., Amibas de Vida Libre, *Naegleria fowleri*, Prevalencia.

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre son protozoarios cosmopolitas, ubicuos ambientalmente, por lo general presentan una forma trófica vegetativa (trofozoíto) y una de resistencia (quiste). Algunas de estas amibas son, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*, conocidas por su papel etiológico de patologías como encefalitis amebianas (Baig, 2015), de baja prevalencia por ser infecciones oportunistas en su mayoría y por ser sub-diagnosticadas, sin tratamiento eficiente de amplia disponibilidad y de rápida evolución (Schuster, 2002). Se conoce que estos organismos se encuentran en contacto constante con los humanos, lo cual es reconocible gracias a evaluaciones inmunológicas, las cuales describen un alto porcentaje de poblaciones con anticuerpos específicos a géneros como el de *Acanthamoeba* spp. (Chappell *et al.*, 2001).

Estos organismos en su forma quística pueden resistir a la acción de diferentes desinfectantes, como es el caso de compuestos clorados y antibióticos, además de poder resistir a una amplia variedad de temperaturas y deficiencia de fuentes de alimento (Thomas *et al.*, 2009), esta resistencia no sólo es un problema para su inactivación, sino que existen microorganismos patógenos para el ser humano, que son resistentes a la fagocitosis efectuada por la amiba para su alimentación; de esta manera pueden residir como endosimbiontes en el interior de las amibas. Estos patógenos resistentes a la fagocitosis

pueden ser bacterias, hongos y virus y se sirven del protozoario como vehículo de entrada al humano y aprovechan la protección que le confiere en su forma quística (Greub & Raoult, 2004). Por otra parte, se ha propuesto que existen mecanismos de transferencia genética entre estos microorganismos simbioses, esto expresado en la selección de rasgos de virulencia mejorados de los patógenos intra-amebicos (Ogata *et al.*, 2006). El objetivo general de esta investigación fue determinar la prevalencia de amibas de vida libre en aguas superficiales y residuales mediante métodos microbiológicos en Reynosa, Tamaulipas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestreo

Los 32 puntos de muestreo se distribuyen en el interior de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, siendo de tres tipos principales: el Río Bravo, dos canales de riego (Anzaldúas y Rhode) que atraviesan la ciudad y un conjunto de cuerpos de agua independiente, como lo es el caso de la Laguna “La Escondida”, calicheras, drenes, entre otros. Este esquema de muestreo fue realizado para abordar el resultado de la actividad antropogénica sobre la prevalencia de estos organismos.

El muestreo se realizó tomando 1 L de agua superficial, asegurando una profundidad mayor a los 30 cm, en un recipiente de vidrio estéril haciendo anotaciones sobre las características de cada punto (fuente del agua, condiciones climáticas, filtraciones de aguas negras y presencia de flora y fauna).

2.2. Procesamiento de muestras

Estas muestras fueron divididas en volúmenes iguales de 500 mL. El primer volumen se repartió en 5 tubos Falcon de 50 mL para su centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el sedimento, del cual se tomaron 25 μ L para visualizarse con ayuda del microscopio y evaluar así la diversidad biológica en las muestras. Posteriormente, el volumen restante de 500 mL se procesó con un filtro de nitrocelulosa marca Whatman®, para la obtención y aislamiento de las amibas por razón de tamaño (0.45 μ m de poro, 25 mm de diámetro).

2.3. Cultivo

El cultivo se realizó colocando el filtro del procesamiento de forma invertida en medio de agar no nutritivo (Medio Page), el cual es adicionado con una capa de *E. coli* inactivada por calor, esto como fuente de alimento. Las placas se sometieron a incubación durante 7 días a 30° C, para ser evaluadas con microscopio óptico para su identificación mediante la búsqueda de quistes y trofozoítos, con las claves de identificación de Page (Page, 1976).

3. RESULTADOS

Un total de 32 muestras se procesaron, encontrado un total de 16 muestras (50%; 16/32) presuntivamente positivas para la presencia de quistes y trofozoítos amibas de vida libre

(Fig. 1), esto con respecto a las claves de Page (1976). Esto representa un alto nivel de prevalencia de AVL, siendo la mayoría de estas muestras de origen natural (río, lago, canales de riego y cuerpos de agua independientes). Es importante mencionar que esta presencia de AVL es indicio de una alta proliferación de bacterias, hongos y otros organismos que son fuentes de alimento para las amibas, por lo que proliferan en biofilmes y en contacto directo con suelo contaminado, basura y zonas de desecho de agua.

De los cuatro orígenes de las muestras, las del Canal Rhode presentó mayor prevalencia con un 25% seguida por las de calicheras en desuso con un 18.75% y luego por las provenientes del Canal Anzaldúas, Río Bravo y la laguna “La Escondida”, con 12.5% respectivamente, como se muestra en la tabla 1. La mayor prevalencia se encontró en los sitios con presencia de basura, estancamiento de agua y con viviendas y tráfico peatonal.

La AVL más prevalente fue *Acanthamoeba* spp. en todos los puntos, encontrando la presencia de quistes en todos los aislados obtenidos y la presencia de trofozoítos fue mayor en aquellos con menor diversidad de protozoarios no patógenos y por origen de muestra la AVL más prevalente fue, de igual manera, *Acanthamoeba* spp. En el caso de *Naegleria fowleri*, no fue detectada en ninguno de los puntos muestreados.

En la totalidad de los puntos también se observó una amplia diversidad de protozoarios no patógenos, en promedio 3 géneros distintos por muestra, además de diferentes microalgas diatomeas y en el caso de la muestra CA07, se observó presencia de nematodos.

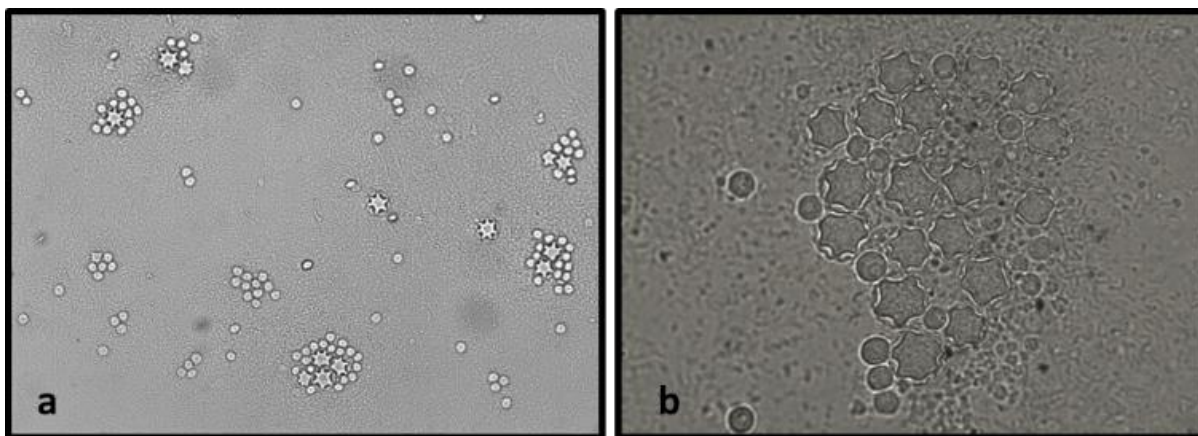


Fig. 1. Cultivo en Medio Page observado en microscopio óptico: Quistes de *Acanthamoeba* spp. con objetivo de a). 40X, b). 100X.

Tabla 1. Descripción de sitios de muestro de aislados positivos para ambas de vida libre.

Clave de muestras	Fuente de las muestras de agua	Observaciones
AN01 AN08	Escurrimiento de aguas negras sobre calle transitada.	Agua estancada, presencia de basura, con flujo vehicular y peatonal.
AZ03 AZ04	Canal de riego “Anzaldúas”.	Agua con flujo de corriente, presencia de basura, con flujo vehicular y peatonal.
CA04 CA07 CA12	Antiguas calicheras inundadas, en desuso.	Agua estancada, presencia de basura, con flujo vehicular y peatonal y presencia de hogares habitados en la circunferencia.
DR01	Dren de desecho de aguas negras, abierto sin protección de acceso.	Agua estancada, presencia de basura y flujo de desecho hospitalario, flujo vehicular y peatonal.
LE03 LE04	Laguna “La Escondida”.	Agua estancada, presencia de basura, flujo peatonal, zona recreativa municipal.
RB04 RB07	Río Bravo.	Agua con flujo de corriente, presencia de basura, con flujo vehicular adyacente.
RD02 RD05 RD06 RD13	Canal de Riego “Rhode”.	Agua con flujo de corriente, presencia de basura, con flujo vehicular y peatonal.

4. DISCUSIÓN

En México, existe una falta de reportes sobre detección de estos organismos (Lares-Villa & Hernández-Peña, 2010; Bonilla-Lemus *et al.*, 2014). Este abordaje en el estado de Tamaulipas es el primero de su clase y el primero en describir presencia de amibas de vida libres consideradas patogénicas. La evaluación realizada en los puntos de muestreos descritos concuerda con lo reportado por (Baig, 2015; Khan *et al.*, 2006), con respecto a la alta proliferación de estos organismos en climas cálidos, en cuerpos de agua con alta contaminación, esto a causa de un exceso de fuentes de alimentación, además de condiciones de desarrollo ideales para el protozooario, esto se puede observar al ser un 50% de las muestras en donde se puede observar quistes de *Acanthamoeba* spp. y presencia de trofozoítos de esta. De igual manera se puede observar la presencia de otros protozoarios no patógenos en la evaluación de los sedimentos de cada uno de los puntos, haciendo notable que pueden compartir nichos biológicos, como parte de su proliferación, como se ha descrito anteriormente en la literatura (Liang *et al.*, 2010)

Con los resultados obtenidos al momento se puede inferir que *Acanthamoeba* spp. tiene una distribución amplia en la región de Reynosa, Tamaulipas y está puede verse afectada por

factores antropogénicos, como se observó en los puntos de muestreo. Con respecto a la evaluación de las especies, han existido una serie de discrepancias por la similitud reportada entre especies del mismo género y de diferentes familias, las cuales requieren de una inspección minuciosa (Schuster & Visvesvara, 2004), por lo que estudios confirmatorios y más detallados son necesarios, como lo son el caso de métodos moleculares, los cuales elucidan, de forma clara y precisa, las especies con las que se está tratando.

AGRADECIMIENTOS

OACM agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada y VBG al SNI, COFAA y EDI por la beca otorgada.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en la elaboración y desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

Baig A. M. 2015. Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an “inside job” done by the host immune response? *Acta Tropica*. 148, 72-6.

Bonilla-Lemus P. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental Parasitology*. 145, 28-33.

Chappell C. L., Wright J. A., Coletta M., & Newsome A. L. 2001. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8(4), 724-30.

Greub G., & Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(2), 413-33.

Khan N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 30(4), 564-95.

Lares-Villa F., & Hernández-Peña C. 2010. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Experimental Parasitology*. 126(1), 33-6.

Liang S.Y., Ji D.R., Hsia K.-T., Hung C.C., Sheng W.H., Hsu B.M., Ji D.D. 2010. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field. *Journal of Applied Microbiology*. 109(4), 1422-1429.

Ogata H., La Scola B., Audic S., Renesto P., Blanc G., Robert C., Fournier PE., Claverie JM. & Raoult D. 2006. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. PLoS Genetics. 2(5), 76.

Page F.C. 1976. A revised classification of the Gymnamoebia (Protozoa: Sarcodina). Zoological Journal of the Linnean Society. 58(1), 61-77.

Schuster F.L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clinical Microbiology Reviews. 15(3), 342-54.

Schuster F.L. & Visvesvara G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. International Journal for Parasitology. 34(9), 1001-1027.

Thomas V., McDonnell G., Denyer S.P., Maillard J.Y., Abd H., Johansson T. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiology Reviews. 34(3), 231-59.