

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

Aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en salas cerradas de un hospital de la provincia de Buenos Aires, Argentina

► Lorian Tomassini^{1a}, Sixto Raúl Costamagna^{2b*}, Viviana Randazzo^{3c}

Resumen

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos ubicuos con cuatro géneros patógenos para el ser humano: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, y *Sappinia*. *Acanthamoeba* puede actuar como reservorio de microorganismos (endosimbiontes), por lo cual, en medio hospitalario, implicaría un riesgo para la transmisión de bacterias, virus y hongos intranosocomiales. Se investigó la presencia de AVL, con énfasis en *Acanthamoeba* spp., en un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se colectaron 22 muestras de lavamanos e incubadoras en salas de Neonatología y Terapia Intensiva, las que fueron cultivadas a 37 y 42 °C. Los aislados fueron identificados molecularmente. El 63,64% de las muestras presentaron *Acanthamoeba* spp. Esta investigación representa el primer estudio realizado en la Argentina sobre la detección de *Acanthamoeba* spp. en salas cerradas de un hospital. Su presencia es una señal de alarma y resulta un blanco útil para investigar posibles reservorios de microorganismos patógenos en ambientes hospitalarios.

Palabras clave: Amebas de vida libre; Protozoos; Reservorio; Ambiente hospitalario; Resistencia a desinfectantes

Isolation of Acanthamoeba spp. in closed rooms of a hospital in Buenos Aires province, Argentina

Abstract

Free-living amoebae (FLA) are ubiquitous protozoa with four pathogenic genera for humans: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, and *Sappinia*. *Acanthamoeba* can act as a reservoir of microorganisms (endosymbionts), for which reason, in a hospital environment, it would imply a risk for transmission of nosocomial bacteria, viruses and fungi. The presence of AVL, with emphasis on *Acanthamoeba* spp., was investigated in a pediatric hospital. Twenty-two samples were collected from sinks and incubators in Neonatology and Intensive Care rooms, which were cultured at 37 and 42 °C. The isolates found were molecularly identified. A total of 63.64% of the samples presented *Acanthamoeba* spp. This research represents the first study in

¹ Bioquímica, Especialista en Bioquímica Clínica, Área Parasitología.

² Doctor en Bioquímica. Master Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales. Especialista en Bioquímica Clínica, Área Parasitología.

³ Doctora en Bioquímica. Especialista en Bioquímica clínica Área Parasitología.

^a Cátedra de Parasitología Humana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

^b Cátedra de Parasitología. Carrera de Bioquímica. Universidad Maimónides. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c Cátedra de Microbiología y Parasitología. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de Sur. Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.

* Autor para correspondencia.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Argentina on the detection of Acanthamoeba spp. in closed rooms of a hospital. Its presence is an alarm signal, and it is a useful target to investigate possible reservoirs of pathogenic microorganisms in hospital environments.

Keywords: Free-living amoebas; Protozoa, Reservoir; Hospital environment; Resistance to disinfectants

Isolamento de Acanthamoeba spp. em salas fechadas de um hospital da província de Buenos Aires, Argentina

Resumo

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubíquos com quatro gêneros patogênicos para o ser humano: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, e *Sappinia*. *Acanthamoeba* pode atuar como um reservatório de microrganismos (endossimbiontes), e portanto, em um ambiente hospitalar, representaria um risco de transmissão de bactérias, vírus e fungos intra-nosocomiais. A presença de AVL, com em *Acanthamoeba* spp. em um hospital pediátrico da província de Buenos Aires, Argentina, foi investigada. Vinte e duas amostras foram coletadas em lavatórios e incubadoras em Salas de Neonatologia e Cuidados Intensivos, cultivadas a 37 e 42 °C. Os isolados foram identificados molecularmente. Foram encontradas *Acanthamoeba* spp. em 63,64% das amostras. Esta investigação representa o primeiro estudo realizado na Argentina sobre a detecção de *Acanthamoeba* spp. em salas fechadas de um hospital. A sua presença é um sinal de alarme e um alvo para investigar possíveis reservatórios de microrganismos patogênicos em ambientes hospitalares.

Palavras-chave: Amebas de vida livre; Protozoários; Reservatório; Ambiente hospitalar; Resistência a desinfetantes

Introducción

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos anfitriónicos con capacidad de provocar enfermedades en el ser humano que afectan al sistema nervioso central, la piel y/o la córnea (1) (2) (3). El ciclo de vida de estos protozoos está compuesto por dos estadios diferentes: los trofozoitos, formas tróficas y reproductivas, metabólicamente activas, que se alimentan, se mueven y multiplican, y los quistes o estadios de resistencia, capaces de permanecer viables durante años en el ambiente. Existen cuatro géneros de AVL potencialmente patogénicos para el ser humano: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia* y, si bien las patologías que producen son poco frecuentes, resultan graves y con elevada morbimortalidad. *Acanthamoeba* spp. se encuentra entre las AVL ambientales más prevalentes con distribución cosmopolita. Es agente etiológico de queratitis, encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) e infecciones de la piel. La mayor parte de los casos humanos tienen en común el uso de agua con escasa calidad sanitaria (1) (2).

Desde la mitad del siglo XX se ha vinculado a las AVL con la transmisión y perpetuación en el ambiente de diferentes microorganismos potencialmente patógenos (4). Investigaciones recientes confirman la capacidad de *Acanthamoeba* spp. para actuar como vehículo de transmisión de microorganismos productores de diversas patologías de interés en salud pública (verdaderos

vectores biológicos) (5) (6) (7). *Acanthamoeba* fagocita estos organismos presentes en el medio ambiente y algunos de ellos pueden escapar de sus sistemas líticos multiplicándose en su interior. Esta multiplicación puede provocar la lisis de los trofozoitos o bien la perpetuación y la permanencia en su interior, aún en los quistes. Los microorganismos que sobreviven a la fagocitosis, se denominan microorganismos resistentes a las amebas (MRA o ARM por sus siglas en inglés). Bacterias, hongos, protozoos y virus patógenos se han descrito como ARM (3) (5). Ambas condiciones, reservorio o capacidad endosimbiónica, resultan de vital importancia para la perpetuación de la cadena epidemiológica de muchas enfermedades infecciosas con impacto en la salud pública y han convertido a las AVL en verdaderos bioindicadores ambientales.

En la Argentina no existen publicaciones que hayan mencionado la presencia de *Acanthamoeba* spp., y otras AVL, en el ambiente hospitalario. Su detección podría ser de utilidad en el momento de investigar posibles reservorios de microorganismos patógenos de circulación intrahospitalaria. Su vigilancia y control podrían ser herramientas fundamentales para reducir el impacto negativo de las infecciones asociadas al cuidado de la salud. Por otro lado, el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. y otras AVL dentro del ambiente hospitalario interpelarían el concepto de efectividad de las medidas de desinfección utilizadas dentro de los establecimientos de salud. La resistencia intrínseca a los desinfectantes que

poseen estos protistas impulsaría acciones a encontrar nuevos agentes biocidas útiles y efectivos frente a estos verdaderos “caballos de Troya” biológicos (3) (6).

En este contexto el objetivo del presente estudio fue investigar la presencia de *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp., en salas cerradas de un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires, Argentina, por su potencial rol como reservorios de endosimbiontes de importancia sanitaria.

Materiales y Métodos

La investigación se llevó a cabo en salas cerradas de un hospital de la provincia de Buenos Aires, Argentina. El estudio fue avalado por el Comité de Docencia e Investigación de la Institución.

Muestras

Desde enero a octubre de 2021 se colectaron 22 muestras correspondientes a lavamanos utilizados por personal sanitario, y equipamientos con reservorios de agua (incubadoras con microclima y humidificadores respiratorios) en salas cerradas un hospital de la provincia de Buenos Aires. Un total de 16 muestras correspondieron a la sala de Neonatología (4 lavamanos y 12 incubadoras con sistema de microclima marca Atom y Medics) y 6 muestras a Terapia Intensiva (4 lavamanos y 2 incubadoras marca Funovert). Debido a la infraestructura y disponibilidad del lugar, el número de incubadoras en la sala de Neonatología fue mayor que el de la sala de Terapia Intensiva (12 vs. 2).

Las muestras de lavamanos fueron obtenidas mediante hisopados del interior de las canillas y sus respectivos desagües. En el caso de los equipamientos con reservorio de agua (incubadoras y humidificadores), se tomaron hisopados de las áreas de condensación del microclima (marca Medic) o los últimos 5-10 mL del reservorio de agua (marca Atom y Funovert).

Se incorporaron 2 mL de solución de Page (7) a cada tubo que contenía el hisopo remitido. A dichos tubos se los dejó en contacto durante 24 h luego de homogeneizar la muestra (vórtex), con el fin de que, si la muestra contenía AVL, se desprendieran del hisopo y pasaran a la solución. En el caso de las colecciones de agua, éstas se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 2 mL de solución de Page. Estas muestras se conservaron a temperatura ambiente. A partir de estas soluciones, posteriormente se realizaron los cultivos.

Cultivos

Las muestras obtenidas por hisopado fueron sembradas en placas de Petri con agar no nutritivo (Britania)

suplementado con *Escherichia coli* ATCC 25922 en solución de Page (7) e incubadas en estufas de cultivo a 37 °C y a 42 °C, para garantizar la recuperación de especies termófilas.

Las placas fueron monitoreadas durante 15 días. Para determinar la existencia de crecimiento parasitario, se realizaron observaciones con un microscopio óptico (entre cubre y portaobjetos) en 100 y 400 aumentos cada 24 horas. El cultivo fue considerado positivo cuando se observaron trofozoítos y/o quistes morfológicamente compatibles con AVL. Las placas con ausencia de crecimiento fueron consideradas negativas luego de 15 días de incubación.

En los cultivos positivos se estudiaron las características morfológicas y morfométricas de trofozoítos y quistes. Para esto, se colocaron 500 µL de solución de Page, se dejó 30 segundos en contacto y se tomó un volumen equivalente para realizar la observación microscópica de las estructuras. La identificación genérica se realizó según Page (7) y para identificar *Naegleria* sp., se procedió a la prueba de transformación ameboflagelar (8) (9).

La observación microscópica se realizó mediante un microscopio Leica DM500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) con *software* Leica LAS EZ (v3.2.1) y las imágenes se registraron mediante una cámara Leica ICC50 HD (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

Posteriormente se realizó la identificación molecular del total de los aislados.

Extracción de ADN e identificación molecular de *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp. utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se extrajo ADN genómico de las muestras positivas utilizando el kit de extracción Quick-gDNATM Mini-Prep de ZYMO Research- Epigenetics Company.

Las muestras fueron sometidas a una PCR con cebadores específicos (Invitrogen - Massachusetts, EE.UU.) para amplificar un fragmento del gen *18S rDNA*. Para el género *Acanthamoeba* se utilizó el par de cebadores específicos JDP1 (5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3') y JDP2 (5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3').

Para el género *Naegleria* se usaron ITSTF (AACCT-GCGTAGGGATCATTT) e ITSTR (TTTCCTCC CCT TATTAATAT).

Se realizó la mezcla de reacción con 2,5 µL de *buffer* (Promega), 0,5 µL de una mezcla de DNTP (10 mM de cada uno, Promega), 1,5 µL (20 µM) de cada cebador, 1,25 U Taq (Promega) y 5,0 µL de ADN. Se llevó a 25 µL de volumen final con agua libre de nucleasas (Biodynamics). Se utilizó un termociclador IVEMA T18 para la amplificación. Las condiciones de reacción fueron: 95 °C durante 7 min, 45 ciclos (95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min), y una exten-

sión final de 72 °C durante 10 min, siguiendo protocolos publicados por Schroeder *et al.* y Regoudis *et al.* (10) (11). Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis, utilizando una cuba ENDURO LabNet (LabNet International Inc., EE.UU.), en gel de agarosa (Biodynamics) al 1,5% durante 30 min y a 80 mA con tinción de bromuro de etidio durante 15 min. Por cada calle se cargaron 10 µL del producto de la amplificación. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con una escalera (*ladder*) de 100 pb

(PB-L, Productos Bio-Lógicos, Argentina). El resultado de la electroforesis fue visualizado bajo luz UV con un transiluminador Maestro-Gen.

Resultados

Las observaciones microscópicas y el análisis morfológico y morfométrico de los cultivos (Fig. 1) y los resultados de la PCR (Fig. 2) permitieron detectar formas

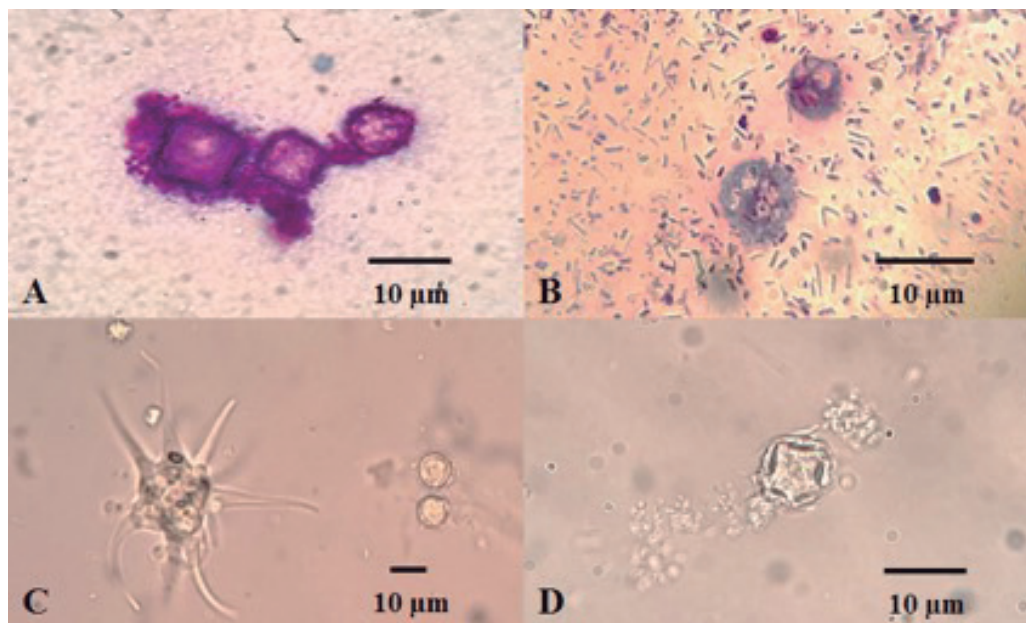


Figura 1. A: Quiste; B: Dos trofozoitos de *Acanthamoeba* sp. coloreados con May Grunwald-Giemsa (100X). C: Trofozoito y dos quistes; D: Quiste tetrahédrico de *Acanthamoeba* sp. sin colorear (40X).

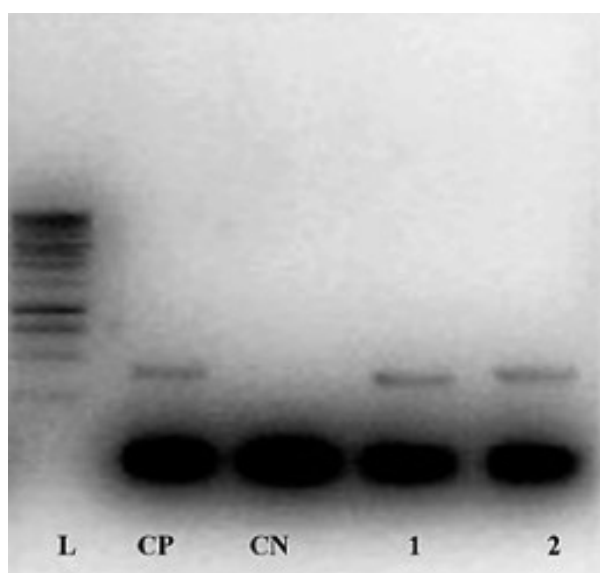


Figura 2. PCR correspondiente a dos muestras: L: ladder; CP: control positivo; CN: control negativo; 1 y 2: dos muestras positivas.

compatibles con AVL, tanto en las muestras correspondientes a Neonatología como a Terapia Intensiva del hospital. En ambos casos se observaron trofozoítos y quistes ornamentados y lisos, de pequeño tamaño ($\leq 5 \mu\text{m}$) compatibles con el género *Acanthamoeba*.

En la sala de Neonatología, el 50% (2/4) de los aislamientos correspondientes a lavamanos (canillas y desagües) y el 66,67% (8/12) de los correspondientes a las incubadoras, fueron confirmados molecularmente como *Acanthamoeba* spp., mientras que, en los aislados de la sala de Terapia Intensiva, se confirmó la presencia de *Acanthamoeba* spp. en el 50% (2/4) de los lavamanos y en el 100% (2/2) de las incubadoras (Tabla I).

Tabla I. Resultados de las muestras positivas

	Lavamanos	Incubadoras	Total positivos
Neonatología	2 (50%)	8 (66,67%)	10
Unidad de Terapia Intensiva (UTI)	2 (50%)	2 (100%)	4
Total de muestras positivas	4	10	14 (63,63%)

Respecto a *Naegleria* spp., tanto la ausencia de crecimiento en las muestras incubadas a 42 °C como el resultado negativo de las pruebas de transformación ameboflagelar (de las muestras cultivadas a 37 °C) permitieron descartar la presencia de este género en las muestras estudiadas.

Discusión y Conclusiones

La presente investigación constituye el primer estudio y aislamiento realizado en la Argentina de *Acanthamoeba* spp. en el ambiente hospitalario.

Coincidiendo con otros autores, los resultados evidenciaron la preocupante ubicuidad, versatilidad y adaptación de AVL al ambiente hospitalario (5) (12) (13) (14). Si bien las AVL se encuentran entre los protozoos ambientales más prevalentes y poseen una distribución cosmopolita, la principal preocupación para la salud pública reside en el hecho de que estos protistas han sido aislados en ambientes diversos relacionados con el sistema sanitario, tales como unidades de tratamiento odontológico, unidades de diálisis, duchas de emergencia y sistemas de refrigeración y aire acondicionado de distintos establecimientos de salud, polvo hospitalario y muestras clínicas (14) (15).

En lo referente al presente estudio, el 63,64% (14/22) de los hisopados de lavamanos e incubadoras muestreados, de las salas de Neonatología y Terapia Intensiva del hospital resultaron positivos para *Acanthamoeba* spp. Si bien existe escasa información acerca del nivel de riesgo para la salud humana y sus asociaciones en el ambiente hospitalario, el aislamiento del proto-

zoario en lavamanos e incubadoras de las Salas Neonatología y Terapia Intensiva del hospital representa una señal de alarma, no solo por el poder patógeno de *Acanthamoeba* spp. frente a pacientes de alto riesgo, sino además por la capacidad del protista de actuar como reservorio de microorganismos de circulación intrahospitalaria (6) (14). Las bacterias, hongos y virus de circulación intrahospitalaria incluyen una diversidad de microorganismos potencialmente patógenos que conducen a enfermedades infecciosas dentro del ambiente hospitalario, razón por la cual resulta fundamental realizar la vigilancia epidemiológica. En este sentido, diversos autores señalaron la preocupante relación entre *Acanthamoeba* spp. y bacterias asociadas a infecciones intranosocomiales (12) (15). La presencia de *Acanthamoeba* spp. en el ambiente hospitalario y su capacidad de actuar como "caballo de Troya" de bacterias multirresistentes y formadoras de *biofilms*, amplificaría la diseminación de las mismas generando infecciones intrahospitalarias severas (3) (6) (11). Al respecto, De Souza *et al.* (13) y Huws *et al.* (15) demostraron mediante cocultivos la interacción endosimbiótica entre cepas de *Acanthamoeba* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La endosimbiosis favoreció el enquistamiento del protozoario y la virulencia y diseminación de MRSA (11). También dificultarían el control de las queratitis y otras patologías endosimbiontes del género *Fusarium* (15).

Por la naturaleza oportunista de *Acanthamoeba* y su papel como reservorio de patógenos humanos, resulta fundamental que los diferentes comités de infecciones hospitalarias dirijan sus esfuerzos para monitorear la presencia de estos protistas en hospitales y centros de salud, implementando medidas de higiene y desinfección eficientes, ya que son fáciles de eliminar con alcohol etílico en 5 min, con lavandina (60 p.p.m. de cloro), etc. (3) (13). Otros métodos han sido evaluados, como el uso de ozono, rayos ultravioleta, radiación solar, etc., con lo cual la elección de éstos va a depender de la relación costo-beneficio y de no exponer a la población a un riesgo mayor (3) (14).

La detección de *Acanthamoeba* spp. en salas cerradas del hospital constituye el primer paso para explicar la posible transmisibilidad y la endemicidad intrahospitalaria de diversos microorganismos. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan una herramienta fundamental para la vigilancia epidemiológica y el control sanitario y contribuyen significativamente a la implementación de estrategias de control en la institución.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración en la toma de muestras de los médicos: Alicia Rodríguez (Neonatología) y Paula Medici y Pablo Vattimo (Unidad de Terapia Intensiva) del hospital.

Fuentes de financiación

El presente trabajo ha sido financiado con los fondos recibidos por la SECyT – UNS para el Proyecto de Grupo de Investigación PGI 24/B273 “Zoonosis y Econosis en el sudoeste Bonaerense” bajo la Dirección de la Dra. Viviana Randazzo.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dr. SIXTO RAÚL COSTAMAGNA
Lezica 4476, piso 5, departamento 20.
1202 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina
Correo electrónico: rcostama2001@yahoo.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30 (4): 564-95.
2. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (2): 273-307.
3. Costamagna SR, Gertiser M, Visciarelli, Basabe N, Felice V. *Acanthamoeba* spp: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre. *Salud (i) Ciencia* 2010; 17: 821-6.
4. Krishna-Prasad BN, Gupta SK. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci* 1978; 47: 245-7.
5. Mella C, Medina G, Flores-Martin S, Toledo Z, Simaluiza RJ, Pérez-Pérez G, *et al.* Interaction between zoonotic bacteria and free living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance? *Arch Med Vet* 2016; 48: 1-10.
6. Iglesias-Osores S. Infección amebiana con *Staphylococcus aureus* MRSA, alerta microbiana en los hospitales. *Rev Cuerpo Méd HNAAA* 2019; 12 (2): 178-9.
7. Page FC. A new key to freshwater and soil *Gymnamoebae*: with instructions for culture. *Ambleside: Freshwater Biological Association, Harvard*, 18 Edición. Cambridge, MA, Estados Unidos, 1988.
8. Molet B, Kremer M. Techniques d'études et criteres morphologiques pour l'identification des amibes libres. *Bull Soc Sci Vet Med Comp Lyon* 1976; 78: 215-24.
9. Gertiser ML. Aspectos biológicos y epidemiológicos de amebas de vida libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp. (Tesis Doctoral en Bioquímica. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, Argentina); 2015.
10. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, *et al.* Use of subgenus 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1903-11.
11. Regoudis E, Pélandaki M. Detection of the free living amoeba *Naegleria fowleri* by using conventional and real-time PCR based on a single copy DNasequence. *Experimental Parasitology* 2015; 161: 35-9.
12. Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 2010; 60 (3): 185-90.
13. De Souza TK, Soares SS, Benitez LB, Rott MB. Interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. *Curr Microbiol* 2017; 74 (5): 541-9.
14. Bullé DJ, Benitez LB, Rott MB. Ocorrência de *Acanthamoeba* em hospitais: uma revisão da literatura. *J Epidemiol Infect Cont* 2020; 10 (2): 174-80.
15. Huws SA, Smith AW, Enright MC, Wood PJ, Brown MRW. Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA. *Environ Microbiol* 2006; 8 (6): 1130-3.

Recibido: 8 de febrero de 2022

Aceptado: 16 de junio de 2022