

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

AMEBAS DE VIDA LIBRE POTENCIALMENTE PATÓGENAS EN LA BAHÍA DE MARACAIBO Silvana B. Pertuz-Belloso y Nairobi C. Jiménez- Mendoza.....	102
INDUCCIÓN QUÍMICA DE POLIPLOIDÍA EN EL MOLUSCO BIVALVO <i>Polymesoda solida</i> (PHILIPPI, 1846) (BIVALVIA: CORBICULIDAE) Desireé Revilla Ramírez, Francisco Báez Contreras, Yajaira García de Severeyn, Héctor Severeyn, Patricia Villamediana Moreal.....	121
REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE CUATRO CULTIVARES DE PAPA (<i>Solanum tuberosum</i> L.) A PARTIR DE SECCIONES DE HOJA Y EN PRESENCIA DE DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO Torres Jhonathan, Geine Alvarado y Alexander Hernández.....	134
CRUSTÁCEOS ASOCIADOS AL BANCO NATURAL DE PEPITONA (<i>Arca zebra</i> SWAINSON, 1833) EN EL NORORIENTE DE VENEZUELA Roberto Díaz-Fermín, Vanessa Acosta Bálbos, Luisana Pereda – Figuera y Aulo Apointe.....	147
ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>Atrina seminuda</i> Y <i>Pinna carnea</i> (BIVALVIA: PINNIDAE) EN LA ISLA DE CUBAGUA, VENEZUELA María Salomé Rangel y Alejandro Tagliafico.....	164
USO DE SUSTRATOS Y DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO EN EL ENRAIZAMIENTO DEL ICAICO (<i>Chrysobalanus icaco</i> L.) MEDIANTE ESTACAS Maribel Ramírez Villalobos, Brígida Caraballo y Aly Urdaneta.....	181
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.....	191
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS.....	201

Vol.50, Nº 2, Agosto 2016

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



Amebas de vida libre potencialmente patógenas en la bahía de Maracaibo.

Silvana B. Pertuz-Belloso¹ y Nairoby C. Jiménez- Mendoza²

¹Departamento de Biología Comparativa. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.spertuzster@gmail.com.

²Unidad Educativa, Liceo Aurelio Beroes, Maracaibo, Zulia. Código Postal 4005. Venezuela.

Resumen

Las amebas de vida libre están asociadas a enfermedades del sistema nervioso, ocular, y en muchos casos a enfermedades de la piel, que pueden ocasionar la muerte de niños o adultos inmunocomprometidos. El impacto de estos patógenos sobre la salud pública poblacional ha sido reportado en Venezuela y otros países del mundo. En este estudio el objetivo principal fue investigar la ocurrencia de las amebas de vida libre en diferentes ambientes de la Ciudad de Maracaibo (Venezuela). Para esto muestras ambientales: agua, suelo y piscinas públicas y privadas fueron colectadas en la zona Norte y Noroeste de Maracaibo; luego de lo cual fueron procesadas para aislamiento e identificación de las amebas de vida libre, usando el método clásico de cultivo en agar no nutritivo con *Escherichia coli*. Muestras de origen humano: Hisopados nasales fueron también colectadas e inoculadas en tubos con agar no nutritivo sembrado con *Escherichia coli*. Los resultados muestran que en el ambiente de Maracaibo: Un 80% de las especies identificadas pertenecieron al género *Acanthamoeba* en playas y parques recreacionales. Un 60% de las especies identificadas en piscinas y muestras de origen humano pertenecieron al género *Naegleria*. Un 20% de especies pertenecientes a los géneros *Hartmanella* y *Vahlkampfiia* fueron detectadas también en playas y parques recreacionales. La detección de amebas de vida fue alta en playas muestreadas en la Ciudad de Maracaibo en comparación con otros lugares muestreados. En conclusión, el género *Acanthamoeba* y sus especies fue el que presentó mayor prevalencia en el ambiente de Maracaibo.

Palabras Clave: Amibas de vida libre; *Naegleria*; *Acanthamoeba*; ambiente; Ciudad de Maracaibo; playas; piscinas y parques.

Pathogenic free living amoeba at the bay of Maracaibo.

Abstract

Free-living amoeba has been related to diseases of nervous system, eyes and skin associate to murder of children and immunocompromised adults. The impact of these pathogens on the public health has been reported in many countries include to Venezuela. The objective of this work was investigate the occurred of free-living amoebae from different environments of Maracaibo. For this, samples from environment: Water, soil and swimming pools were collected at the North and Northwest of Maracaibo; and then the samples were proceeded to isolated and identification of free-living amoeba, using to classic method for the growth on the not nutritive agar plate's together *Escherichia coli*. Samples from human were collected with swabs and incubated on the agar together *Escherichia coli*. The results show that at the Maracaibo environment: An 80 percent of species detected at the beaches and parks belong to *Acanthamoeba* genus. An 60 percent of species detected at the swimming pools and human samples belong to *Naegleria* genus. An 20 percent of another of species belonging to *Hartmanella* and *Vahlkampfia* genus were detected at the beaches and parks. The beaches had more detecting of free living amoeba than others sampling places. Conclusion, *Acanthamoeba* genus and their species presented more frequency in the Maracaibo environment.

Key Words: *Acanthamoeba*; *Naegleria*; Free-living amoeba; Maracaibo City; environment; swimming pools; soil; park and beaches.

Introducción

Las amebas de vida libre son protozoarios eucariotas muy exitosos en el ambiente. Diversas especies del genero *Acanthamoeba* y *Naegleria* han sido detectadas en piscinas, lagos, acuarios, estanques, líneas de agua de consultorios odontológicos, entre otros. Las amebas de vida libre han sido también encontradas en sedimentos marinos, suelos y en la atmósfera de las grandes ciudades (Conza et al. 2013; Sawyer et al. 1993; Leiva et al. 2008; Muñoz et al. 1993).

La importancia de la clasificación y el análisis de la presencia de las amebas de vida libre en el ambiente están relacionados con las enfermedades a las que se han asociados los miembros de este grupo, sin restar preponderancia a su biodiversidad en los diferentes ambientes que aún no es conocida completamente. Hasta el momento hay reportes que señalan que las amebas de vida libre son altamente competitivas presentando altas tasas de depredación, vistas *in vitro* como tasas de fagocitosis, y altas tasas de *clearing* de bacterias; haciendo de este grupo de microorganismos reguladores de las poblaciones bacterianas en el ambiente, que puede incluir cavidades de mamíferos o el ambiente acuático o el suelo; explicando de esta manera su gran biodiversidad (Pertuz-Belloso y Ramírez-Flores 2014; Pertuz et al. 2003; Pertuz et al. 2002).

Las enfermedades ocasionadas por las amebas de vida libre tienen espectros limitados al sistema nervioso y daño a la mucosa ocular y las infecciones, en todos los casos, ocurren en sujetos inmunosuprimidos. Existen varios reportes de que el contacto con aguas recreacionales o de nado pueden en algunos casos estar asociados a cuadros de neuro-encefalitis. En la Ciudad de Maracaibo no existen hasta el momento reportes claros acerca de la incidencia de las amebas de vida libre en parques, playas y piscinas de uso recreacional y deportivo; sin embargo, si han sido reportados casos de encefalitis o meningitis en niños y adultos vulnerables, en los cuales se ha podido detectar la presencia de especies de *Acanthamoeba* en muestras clínicas, sin poder determinar la fuente de infección de estos pacientes que con frecuencia fallecen; surgiendo así la necesidad de estudios de las amebas de vida libre en ambiente acuático de Maracaibo y otras ciudades costeras de Venezuela.

El contacto, por lo tanto, con aguas de lagos, aguas termales o arroyos contaminados con trofozoítos de *Naegleria* o *Acanthamoeba* ha sido catalogado como un factor desencadenante de neuro-encefalitis o enfermedades asociadas. Los trofozoítos de *Naegleria*, principalmente, atraviesan la cavidad nasal o la barrera cutánea, por mecanismos aún no determinados; generando la infección, y en muchos casos, la muerte de los pacientes. El ambiente, consecuentemente, está asociado con la adquisición de estos patógenos, y las enfermedades que originan. A nivel de la salud poblacional existen reporte de casos de meningitis y enfermedades asociadas, sin que sea posible la detección de agente etiológico causante. Varios investigadores señalan que estos casos podrían estar asociados con *Naegleria fowleri* o amebas de vida libre relacionadas; directamente relacionadas al ambiente (Cruz y Rivera 2014; Zamora *et al.* 2014; Pérez de Galindo 2011; Cermeño *et al.* 2006; Petit *et al.* 2006). Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue el análisis de la ocurrencia de amebas de vida libre potencialmente patogénicas en diferentes ambientes en Maracaibo (Venezuela).

Materiales y Métodos

Área de Estudio. Las muestras fueron colectadas en la zona norte y noroeste de Maracaibo (Estado Zulia Venezuela: 10° 40" latitud Norte y 71° longitud Oeste).

Estaciones de Muestreo. Los puntos de muestreo fueron los señalados en la Figura 1. Para determinar la presencia de las amebas de vida libre en el ambiente de la ciudad de Maracaibo fueron tomadas muestras de agua y suelo en playas y parques recreacionales; muestras de agua y material adherido a las paredes en piscinas, y muestras de aguas residuales. Todas las muestras fueron tomadas por triplicados en un muestreo puntual: Playas y parques recreacionales. Parque "El Mirador"; "Puerto Caballo"; "Santa Rosa de Aguas"; Playa "Isla Dorada"; Playa "La Policía"; Parque "Laguna de Las Peonías". Piscinas públicas y privadas: Del "Rectorado"; "Casa del Profesor", ambas de la Universidad del Zulia; "Colegio de

Médicos”; “Fundación del Niño”, Complejo Recreacional y Deportivo “La Cotorera”. Aguas residuales. Planta piloto para el tratamiento de aguas servidas de la Universidad del Zulia.

Colección de muestras ambientales.

Muestras de agua fueron tomadas en un volumen de 500 ml en frascos de vidrio estériles, por simple inmersión. Muestras de suelo fueron tomadas por porciones de 25 g y colocadas en placas de Petri estériles. Muestras de bio películas de las piscinas fueron tomadas por raspado y colocados en tubos estériles con solución salina (0.8%). Todas las muestras fueron trasladadas en hielo, y conservadas en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio.

Colección de muestras de origen humano. Los niños de 7-10 años de edad de la consulta de pediatría fueron muestreados con hisopos estériles a nivel de fosas nasales, siguiendo el protocolo de ética del Hospital Universitario. Los hisopos fueron luego introducidos en un tubo de vidrio estéril con tapa de algodón para su traslado (Shumaker *et al.* 1971).

Procesamiento de muestras.

Muestras de origen ambiental.

Muestras de Agua. Estas fueron sembradas por extensión con espátula de vidrio sobre agar no nutriente (Agar base, Difco) con *Escherichia coli* e incubadas a 37° C y 42° C, de acuerdo al protocolo estándar (Cerva, 1980). Brevemente, las muestras fueron centrifugadas (100g, 2 min). Los pellets fueron incubados en placas de agar no nutriente previamente sembrados con *Escherichia coli* incubados a 37, y 42 °C. Cada 24 horas las placas fueron inspeccionadas en microscopio de inversión a bajo aumento para la detección de trofozoítos de amebas de vida libre. Los trofozoítos caracterizados fueron repicados cada cinco días hasta su identificación. Los trofozoítos catalogados del mismo género eran tomados cortando el agar y colocándolos en medio PGY (2.0% peptona; 0.5% glucosa, 0.5% extracto de levadura, Difco), en tubos de cultivo.

Biopelículas. Material de las paredes de las piscinas adherido a hisopos fue sembrado en tubos con agar no nutriente inclinado e incubado por 1 día a 37 °C y 42° C. Luego, los hisopos se desalojan de los tubos con agar sin nutrientes, y se incubaron bajo las mismas condiciones durante cuatro días, de acuerdo a De Jonckheere (1979). Posteriormente, se siguió el protocolo descrito anteriormente.

Suelo. Estas muestras fueron tamizadas para separar partículas y homogenizadas en solución salina de acuerdo a Sawyer *et al.* (1983). Un mililitro de las mues-

tras de suelo diluidas fueron sembradas en placas de Petri con agar sin nutrientes y con *Escherichia coli* de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

Muestras de origen humano. Los hisopos impregnados con los exudados nasales fueron sembrados en tubos de agar no nutriente inclinado e incubados a las temperaturas señaladas durante 24 hr, tiempo, después del cual, se retiraron los hisopos. Los tubos fueron nuevamente incubados durante cuatro días más, según Shumaker et al. (1971). Luego los cultivos fueron tratados como se describió anteriormente.

Análisis estadísticos y diseño experimental. Un total de 204 muestras fueron colectadas para el análisis de la presencia de amebas de vida libre en los diferentes ambientes de la zona norte y noroeste de la Ciudad de Maracaibo, distribuidas de la siguiente manera: 38 muestras de agua y 18 muestras de suelo de Playas y parques recreacionales; 30 muestras de agua, y 50 muestras de las biopelículas formadas en las paredes de piscinas públicas y privadas; 14 muestras de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas servidas de LUZ. Los datos fueron expresados en porcentaje de positividad para la presencia de las amebas de vida libre identificadas en géneros o especies en los diferentes ambientes muestreados. Los datos, entonces, fueron tratados por ANOVA no pareada, con un margen de confianza del 95% y una significancia medida con una $p < 0.05$, para la comparación de la prevalencia y distribución de las especies o géneros en el software Epi Open versión 3, 2014.

Análisis biológico. La abundancia de los géneros/especies identificadas fue determinada en los ambientes muestreados en playas y parques recreacionales y en piscinas; usando los porcentajes de ocurrencia/prevalencia de los géneros/especies identificados en cada sitio de muestreo en el ambiente de Maracaibo.

Identificación de ejemplares.

Identificación morfológica y taxonómica de las amebas de vida libre. Los trofozoítos fueron identificados siguiendo las características de morfometría, forma de pseudópodos, vacuolas, según la clave de Page (1988). La identificación de los quistes fue realizada en cultivos de más de cinco días de crecimiento en relación a la forma, el opérculo, entre otras características siguiendo, también, la clave de Page (1988). Para la identificación tanto de los trofozoítos como de los quistes de amebas de vida libre aisladas fue realizada la tinción permanente tricrómica, de acuerdo a Cerva (1980). Para esto, preparaciones en láminas de las amebas identificadas taxonómicamente fueron tratadas con el fijador *Shaudinn* (Cloruro de Mercurio tamponado, 6%), y post-fijadas con una mezcla de iodo-alcohol (95%). Posteriormente, las láminas fueron tratadas con una serie de soluciones de alcoholes en concentraciones crecientes, y teñidas por tinción tricrómica de Lillie's [Ponceau B0.005 mM; Fast green 0.025 mM, diluidos en ácido acético glacial; ácido fosfomolibdico 0.025 mM; ácido fosfotugtustinicoo.025 mM, diluidos en agua des-

tilada; solución de ácido acético glacial al 1%], siguiendo el protocolo de Lillie's Trichrome Stain Kit (Hardy Diagnostics). Las amebas de vida libre en las preparaciones permanentes fueron analizadas por microscopía de luz, para la observación de núcleos, flagelos y otras características. La identificación de flagelos y el movimiento fueron, también, realizados sobre los cultivos que se sospecharon como pertenecientes al género *Naegleria*; para lo cual, las placas de agar fueron incubadas con trofozoítos de amebas de vida libre a 37°C por una hora y observadas en microscopio de inversión.

Resultados

En general, los diferentes ambientes muestreados en la Ciudad de Maracaibo presentaron amebas de vida libre, algunas de las especies identificadas son patógenas, y fueron detectadas en sitios de uso recreacional evidenciando un problema de salud pública.

Mostrando un recuento global se realizaron veintisiete aislamientos en muestras de agua en parques recreacionales y playas; cinco aislamientos en muestras de piscinas públicas y privadas; tres aislamientos de muestras de suelos, y siete aislamientos de muestras de exudados nasales de niños sanos.

En global, en el ambiente lacustre de Maracaibo se identificaron *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba polyphaga*, y *Acanthamoeba castellani*, y dos especies *Acanthamoeba* sp. Especies de otros géneros también fueron identificadas: *Hartmannella* sp. y *Vahlkampfia* sp. De las especies del género *Naegleria* fueron identificadas *Naegleria gruberi* y *Naegleria fowleri*, esta última presentó un crecimiento a 42°C (Tabla 1).

Tabla 1: Taxonomía de las especies de amebas de vida libre aisladas del ambiente de la Ciudad de Maracaibo.

Géneros	Descripción
<i>Acanthamoeba</i> sp. (I)*	Trofozoítos en forma alargada con filópodos. Núcleo con zona perinuclear clara. Presencia de vacuolas. De 18 µm de largo x 10 µm de ancho. Quistes de doble membrana, una externa ondulada y una interna poligonal. De 18 µm de diámetro. Crece a 37° C.
<i>Acanthamoeba</i> sp. (II)*	Trofozoítos de 40 µm de largo x 30 µm de ancho. Núcleo con zona perinuclear clara. Vacuolas abundantes (6 aproximadamente). Forma extendida en medio líquido de 40 Quiste de 18 µm de diámetro. Forma estrellada en la membrana interna y ondulada en la externa. 60 µm de largo x 40 µm de ancho. Crece bien a 37° C a 42° C.

- Acanthamoeba* sp. (III)*** Trofozoítos de 16 μm de largo x 14 μm de ancho. Núcleo central, con zona perinuclear clara. Endoplasma granular. Formación de filópodos en varias direcciones. En medio líquido mide 14 μm de largo x 8 μm de ancho. Quiste con la membrana interna poligonal y la externa ondulada. De 16 μm de diámetro, varía entre 10 a 16 μm de diámetro. Crece a 37° C a 42° C.
- Acanthamoeba* sp. (IV)*** Trofozoítos en forma de mano, con prolongaciones o apéndices en la parte anterior. Núcleo uno, con zona perinuclear clara. Mide 14 μm de largo x 12 μm de ancho. Quiste de 16 μm diámetro, con membrana interna estrellada y la externa ondulada. Crece a 37° C.
- Acanthamoeba* sp. (V)*** Trofozoítos de 28 μm de largo x 16 μm de ancho. Forma de pera. Núcleo uno central, con zona perinuclear clara. Presenta proyecciones afiladas (filópodos) radiales en la zona anterior. Quiste redondeado con una membrana gruesa, lisa la cual contiene el mismo. Mide 32 μm de largo x 40 μm de ancho. Presenta al igual que el trofozoíto un núcleo con zona perinuclear clara y proyecciones radiales dispuestas en todo el diámetro
- Acanthamoeba* sp. (VI)*** Trofozoítos semejante a un abanico. Con un núcleo con zona perinuclear clara. Dos vacuolas grandes. Citoplasma granuloso. Mide 80 μm de largo x 66 μm de ancho. En medio líquido mide 37 μm de largo x 20 μm de ancho. Quiste poligonal en la membrana interna y ondulada en la externa. Mide 12 μm de diámetro.
- Acanthamoeba castellani*** Trofozoítos semejante a un abanico con lobópodos. Una vacuola grande. Con un núcleo con zona perinuclear clara y membrana nuclear granulosa. Dos vacuolas grandes. Citoplasma granuloso. Mide 70 μm de largo x 58 μm de ancho (media 61 μm de diámetro). En medio líquido mide 37 μm de largo x 20 μm de ancho. Quiste poligonal en la membrana interna y ondulada en la externa. Mide 31 μm de diámetro. Presencia de núcleos y vacuolas (tres aproximadamente). Crece a 42° C.
- Acanthamoeba hyalina*** Trofozoítos con un núcleo con zona perinuclear clara. Citoplasma granuloso. Formación de pseudópodos en varias direcciones. Una vacuola. Mide 14 μm de diámetro. Quiste poligonal en la membrana interna y ondulada en la externa. Mide 8 a 10 μm de diámetro. Crece a 37° C.

- Hartmannella** sp. Trofozoítos con un núcleo central con zona perinuclear clara que ocupa gran parte del mismo. Citoplasma granulado. Seudópodos varios en uno de los extremos, afilado en el contrario. Una vacuola. Mide 20 μm de largo x 16 μm de ancho. Quiste con membrana externa ondulada e interna poligonal. Mide 10 μm de diámetro. Crece a 37° C.
- Vahlkampfia** sp. Trofozoítos con un núcleo con zona perinuclear clara. Un par de vacuolas. Citoplasma granulado. Formación de pseudópodos en varias direcciones. Mide 10 μm de largo x 10 μm de ancho. Quiste con núcleo central, con una membrana externa ondulada y perforada y una interna poligonal. Mide 8 μm de diámetro. Crece a 37° C.
- Nagleria gruberi** Trofozoítos redondeado o alargado con un solo pseudópodo. Núcleo con zona perinuclear clara. Citoplasma granulado. Mide 24 μm de largo x 14 μm de ancho. Estos en medio líquido miden 30 μm de largo x 20 μm de ancho. Forma flagelar con un núcleo y vacuolas. Mide 18 μm de largo x 14 μm de ancho. Quiste con núcleo central como en el trofozoíto. Mide 10 μm de diámetro. Forma redondeada con una membrana delgada y lisa interrumpida por poros (2 ó 3). Crece a 37° C.
- Nagleria** sp. (I)* Trofozoítos alargados con un solo pseudópodo. Núcleo con zona perinuclear clara. Citoplasma granulado. Mide 34 μm de diámetro. Estos en medio líquido miden 34 μm de diámetro. Forma flagelar con un núcleo y vacuolas. Mide 34 μm de diámetro. Quiste con núcleo central como en el trofozoíto. Mide 10 μm de diámetro. Forma redondeada con una membrana delgada y con un poro. Crece a 37° C a 42° C.
- Nagleria** sp. (II)* Trofozoítos alargados con un solo pseudópodo. Núcleo con zona perinuclear clara, midiendo 4 μm . Citoplasma granulado. Mide 80 μm de largo x 62 μm de ancho. Forma flagelar con un núcleo y vacuolas. Mide 22 μm de largo x 10 μm de ancho. Quiste con núcleo central como en el trofozoíto. Mide 12 μm de diámetro. Forma redondeada con una membrana delgada y sin poro. Crece a 37° C a 42° C.
- Triamastigamoeba** sp. Trofozoítos Forma redondeada. Núcleo con zona perinuclear clara. Una vacuola grande. Mide 36 μm de diámetro. Quiste con núcleo central, vacuolas y otras partículas. Mide 22 μm de diámetro. Forma de lima con una membrana delgada. Crece a 37° C.

* Recategorización a especies, algunas de las cuales no pudieron ser clasificadas, y se clasificaron *Acanthamoeba* sp., o *Naegleria* sp.

La ocurrencia de estas cepas aisladas fue representada en las Figuras 1 y 2, donde se observa la gran frecuencia que presentan algunos de estos géneros de amebas de vida libre en el medio acuático de Maracaibo siendo está muy alta en el estrecho del lago de Maracaibo y en aguas servidas. Un rango del 80-100 % pertenece a los géneros de *Acanthamoeba* y *Naegleria*, y sus especies identificadas. Rangos menores fueron encontrados para los géneros de *Vahlkampfia* (40-60%), y *Hartmannella* (40-20%), y otros géneros tuvieron menor presencia (Fig. 1).

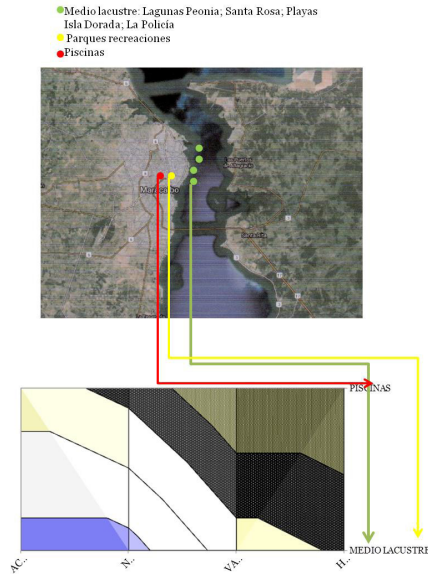


Figura 1: Estaciones de muestreo en la Bahía de Maracaibo. Las muestras fueron tomadas en varios puntos de la ciudad de Maracaibo e incluyen varios ambientes: Playas, Parques recreacionales, y piscinas. **A.** Mapa de Maracaibo (Venezuela) indicando el sitio de muestreo; flechas mostrando la prevalencia de los géneros identificados. **B.** Los géneros aislados e identificados en el ambiente lacustre de la Ciudad de Maracaibo (N=204). Siglas: AC. *Acanthamoeba*. N. *Naegleria*. Va. *Vahlkampfia*. HA. *Hartmannella*.

En los diferentes parques recreacionales estudiados fueron identificados: *Acanthamoeba castellanii*; *Acanthamoeba culbertsoni*, *Naegleria fowleri*, *Vahlkampfia* sp., y *Hartmannella* sp.; principalmente en los parques recreacionales de Santa Rosa de Aguas, y La Laguna de Las Peonias. De la misma manera, las playas muestreadas mostraron varias especie patogénicas, entre ellas, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Naegleria fowleri*. Un análisis de abundancia y distribución de las especies de amebas de vida libre en el ambiente de Maracaibo mostró que las especies con mayor abundancia fueron *Acanthamoeba* sp y *Acanthamoeba castellanii*, esta tendencia se observó en las playas: Isla Dorada, y La Policía. No

obstante, la mayor biodiversidad la presento el sitio de muestreo de Santa Rosa de Aguas. *Naegleria fowleri*, un patógeno, se detectó en todos los parques y playas muestreados en diferentes niveles de abundancia (Fig. 2). El análisis estadístico mostró que estas diferencias fueron significativas ($p < 0.0001$).

Por otro lado, las muestras de suelo presentaron las especies *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba polyphaga* en Isla Dorada; ambas especies patogénicas. Los suelos de la Playa La Policía no presentaron amibas de vida libre, y en los suelos de La Laguna de Las Peonias se hallaron las especies de *Acanthamoeba culbertsoni* y *Vahlkampfia* sp.; siendo la primera patogénica. En los suelos se encontró una proporción diferente mostrando un 66,6 % de *Acanthamoeba* y un 33,3 % de *Vahlkampfia*, no fue posible la detección *Naegleria* (Fig. 4). El género más abundante en el suelo fue *Acanthamoeba*, y su mayor distribución fue en los suelos muestreados en la Playa Isla Dorada (Figs. 2 y 3), y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

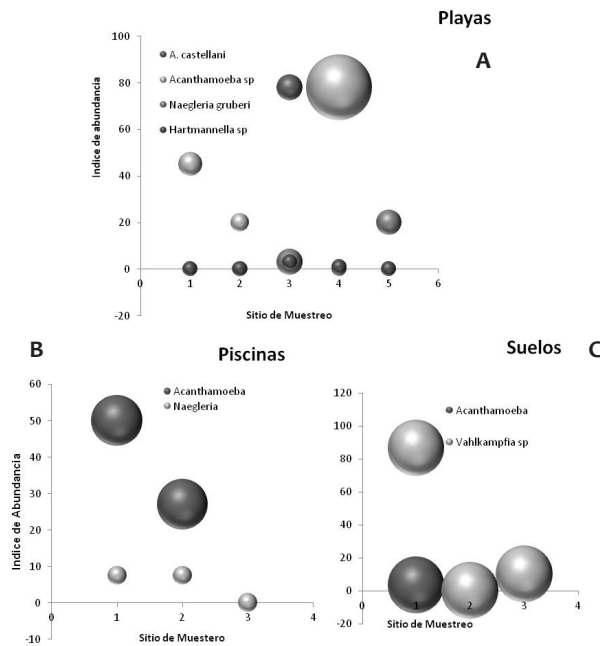


Figura 2. Abundancia de los géneros y especies detectados de amebas de vida libre en playas muestreadas en Maracaibo. A. Clave Sitio de Muestreo. Parques. 1. Parque el Mirador. 2. Puerto Caballo. 3. Santa rosa. 4. Isla dorada. 5. La policía. (N=38; $p > 0.001$). B. Clave Sitio de Muestreo. Piscinas. 1. Casa del Profesor. 2. La Casa de la Fundación del Niño. 3. Complejo Deportivo “La Cotorrera”. La especie de mayor prevalencia en piscinas. (N=30; $p < 0.01$). C. Clave Sitio de Muestreo. Suelos. 1. Playa Isla. 2. Dorada Playa. 3. La Policía. 4. Laguna de las Peonias *Vahlkampfia* sp es la especie de mayor abundancia en suelo. (N=18; $p > 0.001$).

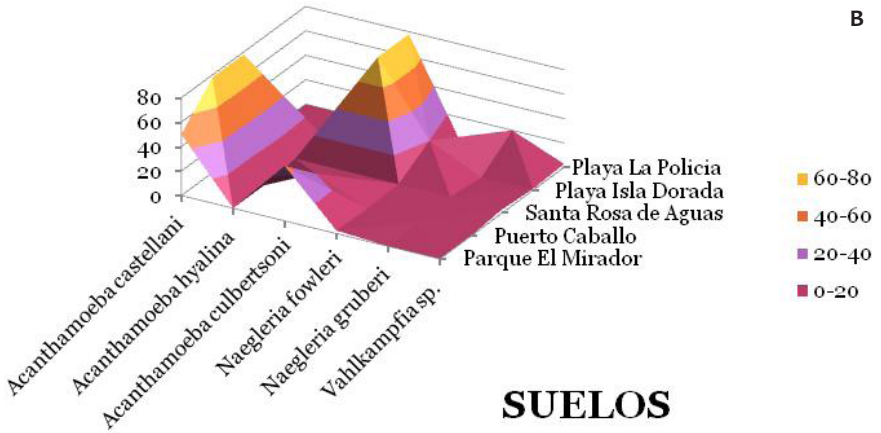
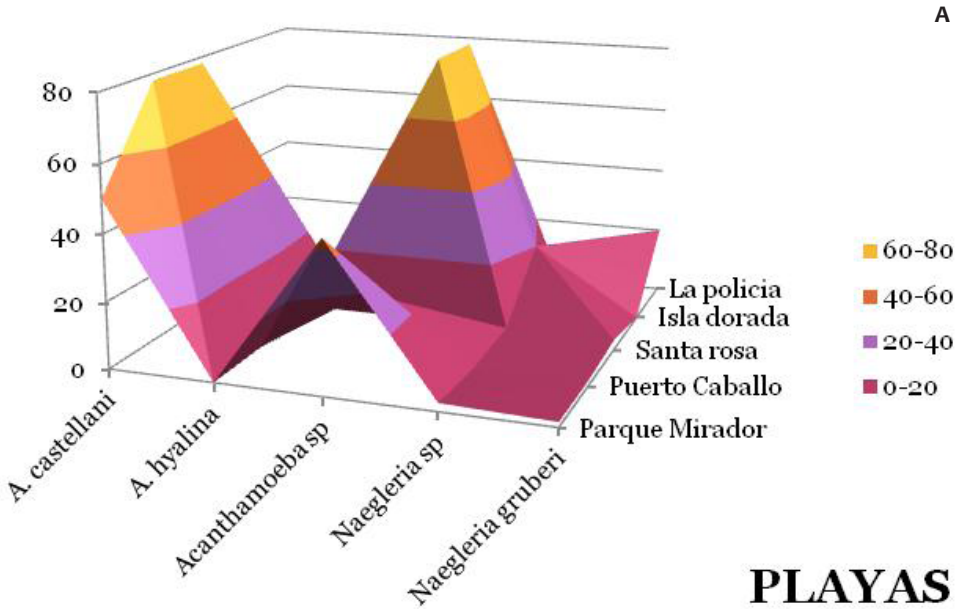


Figura 3. Principales especies de amebas de vida libre en playas y parques recreacionales en Maracaibo. Las muestras fueron colectadas y procesadas como se describió en materiales y métodos. **A.** Playas. **B.** Suelos. Las especies identificadas principalmente *Acanthamoeba castellani* y *Acanthamoeba culbertsoni* con mayor porcentaje de ocurrencia playas y parques de uso recreacional. (N=68).

Las amebas de vida libre fueron aisladas de las piscinas públicas y privadas muestreadas. *Acanthamoeba* sp. y *Naegleria gruberi* fueron detectadas en las muestras de material de las paredes en la piscina del Rectorado de la Universidad Del Zulia. La piscina de La Casa del Profesor presentó *Acanthamoeba* sp., y *Naegleria gruberi* en muestras de material de las paredes y en la columna de agua. La piscina del Complejo Recreacional La Cotorrera fue positiva para *Naegleria gruberi* (Fig. 4).

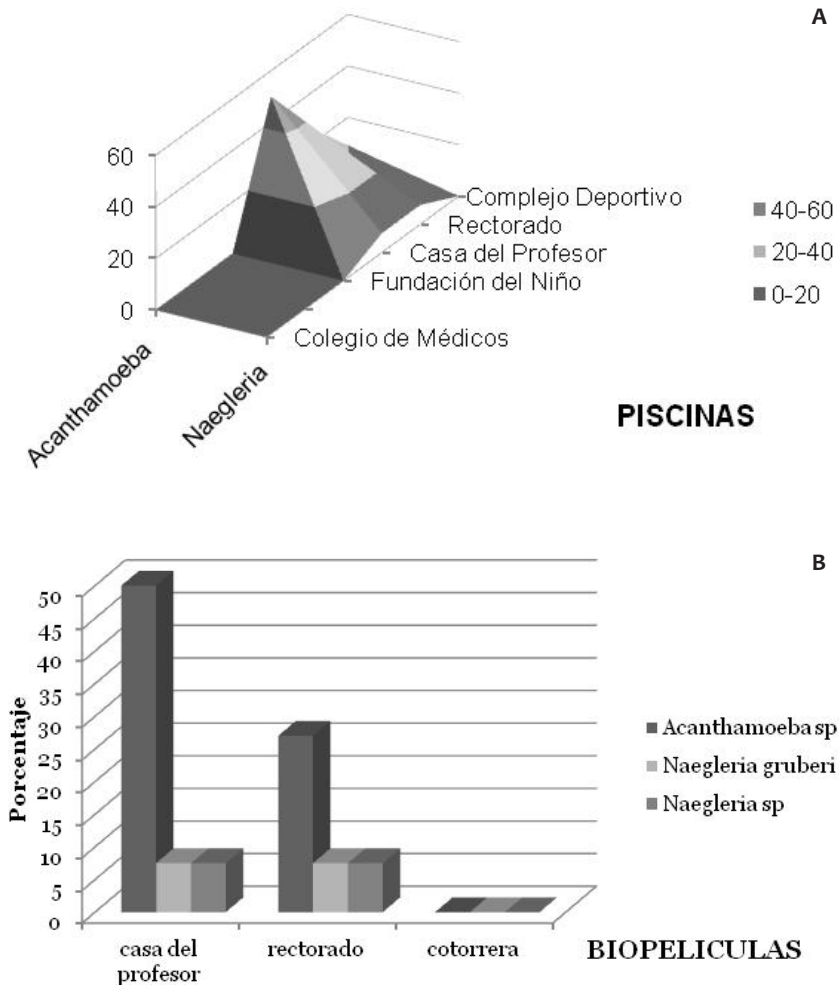


Figura 4. Principales géneros/especies de amebas de vida libre en piscinas en Maracaibo. Las muestras fueron colectadas y procesadas como se describió en materiales y métodos. **A.** Piscinas. **B.** Biopelículas. Las especies identificadas principalmente *Acanthamoeba* sp y *Naegleria gruberi* con mayor porcentaje de ocurrencia en piscinas públicas y privadas muestreadas en Maracaibo. (N=80).

El análisis de abundancia muestra al género *Acanthamoeba* con mayor prevalencia, y a la especie *Naegleria fowleri* con mayor frecuencia. Las amebas de vida libre están distribuidas principalmente en las piscinas privadas (Figs. 2). *Acanthamoeba* sp., *Naegleria* sp. y *Naegleria gruberi* presentaron baja incidencia en las piscinas Casa del Profesor y Rectorado y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

En exudados nasales de niños sanos de la consulta de pediatría del Hospital Universitario (Maracaibo), la prevalencia de amebas de vida libre fue extremadamente baja; estas muestras presentaron a las especies del género *Naegleria* con la mayor prevalencia sobre las especies del género *Acanthamoeba* (Fig. 5), siendo positivas principalmente a *Acanthamoeba* sp. y *Naegleria gruberi*, cepas no patógenas.

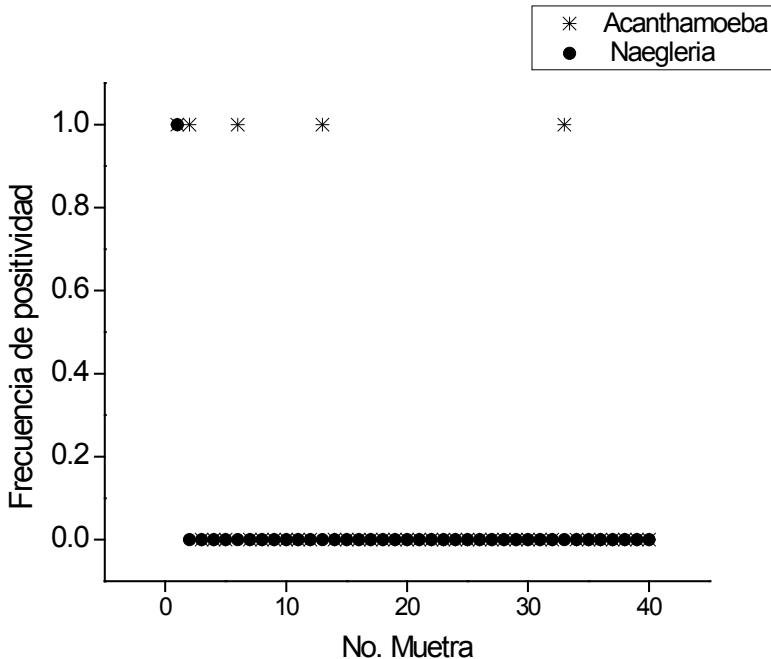


Figura 5. Amebas de vida libre en humanos expuestos. Las muestras fueron colectadas y tratadas como se describió en materiales y métodos. La frecuencia de los géneros identificados en muestras humanas de individuos sanos. N=204.

En aguas residuales se encontró que las especies de *Acanthamoeba* fueron más abundantes que las especies de *Naegleria* y la identificación de las especies *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, y *Naegleria fowleri*, todos los cuales son patógenos identificados, coincidiendo con la constante ocurrencia que tienen estas especies en el resto del ambiente.

Tabla 2. Especies identificadas de *Acanthamoeba*, *Naegleria* y otros géneros de amebas de vida libre.

Sitio de muestreo	Especie Identificada	Tipo de uso
Aguas residuales.	<i>Acanthamoeba castellani</i> <i>Acanthamoeba</i> sp	No apta para consumo humano, ni otras actividades
Parques recreacionales Parque el Mirador	<i>Acanthamoeba castellani</i> <i>Naegleria gruberi</i>	Uso recreacional, comidas al aire libre, deportes acuáticos, carrera, ciclismo.
Puerto Caballo	<i>Acanthamoeba castellani</i> <i>Acanthamoeba hialina</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Naegleria fowleri</i>	Uso recreacional, sitio restaurantero.
Santa Rosa de aguas	<i>Naegleria gruberi</i> , <i>Acanthamoeba hialina</i> <i>Acanthamoeba castellani</i> <i>Vahlkamphia</i> sp. <i>Hartmannella</i> sp. <i>Naegleria fowleri</i>	Alrededores de la Ciudad sin uso designado.
Laguna de las Peonias.	<i>Naegleria gruberi</i>	Uso recreacional, deportes acuáticos
Playas Isla Dorada	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Naegleria gruberi</i>	Uso de recreación, y nado
La policía.	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Trimastigamoeba</i> sp. <i>Hartmannella</i> sp. <i>Vahlkamphia</i> sp. <i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkamphia</i> sp <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba</i> sp	
Piscinas Biopelículas.	<i>Acanthamoeba</i> sp. <i>Naegleria gruberi</i>	Nado, y deportes acuáticos
Suelo Isla Dorada	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Recreacional
La Laguna de las Peonias.	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Vahlkamphia</i> sp.	

En la tabla 2 se observa la distribución por géneros de amebas de vida libre detectados en las muestras provenientes del ambiente de Maracaibo recae sobre los ambientes lacustres en playas y parques recreaciones; en los cuales se encontró la abundancia y diversidad de especies de amebas de vida libre. En contraposición, a las piscinas en las cuales prevalentemente encontramos especies del género *Naegleria*. En suelo, encontramos principalmente *Acanthamoeba* y otros géneros menos prevalentes en el ambiente acuático.

Discusión

Las amebas de vida libre fueron aisladas e identificadas en el ambiente de Maracaibo, principalmente en los lugares de uso recreacional y playas; lo cual podría tener implicaciones en salud pública.

En la bahía del Lago de Maracaibo la ocurrencia de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella* es alta; coincidiendo con estudios realizados en otros países de Latinoamérica (Leiva et al. 2008; Muñoz et al. 1993). La presencia de estos géneros se debe a la resistencia a las presiones ambientales y a la alta adaptabilidad al ambiente. *Acanthamoeba castellani* representa en el medio acuático la contaminación con desechos residuales, debido a que esta especie está fuertemente ligada a dichas aguas; como lo demuestran nuestros resultados, en donde, *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba castellani* fueron encontrados en altos niveles, lo cual representa un hallazgo relevante de este trabajo. La detección de *Naegleria gruberi* y *Acanthamoeba hyalina* fue alarmante por el significado de patogenicidad oportunista, sin incluir especies de *Acanthamoeba* que no pudieron ser separadas de algunas de las especies descritas en este estudio, y que pueden llegar a ser patógenas. Géneros con menor frecuencia, y los cuales no fueron sino identificados solamente como *Hartmannella* sp., están reportados como agentes dispersores de bacterias patogénicas, tales como *Legionella*, y *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae*, contribuyendo importantemente a los factores desencadenantes de Legionelosis, o tuberculosis. Los quistes de amebas de vida libre representan una forma probable de dispersión de estas bacterias patogénicas, es a través de los aerosoles que se forman en el ambiente; de allí que la presencia este género significa un riesgo para la salud humana. En este estudio, se encontró varios géneros de amebas de vida libre, tanto en sitios de uso recreacional, como parques; en los cuales, aunque la población no esté en contacto directo con las aguas, como es el caso de playas, si existe un riesgo de exposición a los aerosoles poniendo en riesgo la salud; este es el caso de los sitios recreacionales (Conza et al. 2013; Wheat et al. 2014). El otro género de menor prevalencia en este estudio es *Vahlkampfia*, que aunque no está asociado hasta el momento a un brote en específico se ha reportado que genera daño celular. En este estudio se identificó una *Vahlkampfia* sp., que es considerada un patógeno potencial oportunista (Kinneer et al. 2003)

Los géneros de *Naegleria* y *Acanthamoeba* fueron aislados de dos piscinas privadas y una pública, con una baja prevalencia, coincidiendo de esta manera con Muñoz *et al.* (2003). Al igual que otros estudios *Naegleria gruberi* fue aislada de aguas de piscinas en Maracaibo (Venezuela). La distribución de *Naegleria* en Maracaibo presentó mayor ocurrencia que *Acanthamoeba* al igual que en otros estudios realizados en Latinoamérica (Muñoz *et al.* 2003; Beltrán y Uyema 1997). Estos géneros fueron también aislados de las biopelículas formadas en paredes de algunas piscinas, desde este nivel, es posible que los trofozoítos se adhieran a las biopelículas protegiéndose del cloro y otros agentes desinfectantes. Las biopelículas formadas en piscinas, y demás redes de tuberías están integradas por bacterias, como *Legionella*, y amebas de vida libre, especialmente especies del género *Acanthamoeba*, entre otros organismos; siendo estas importantes en la dispersión de estos patógenos (Lau y Ashbolt 2009).

La ocurrencia de *Naegleria gruberi* en exudados nasales de niños sanos es un indicativo de que desde muy temprana edad existe el contacto con estos géneros desde el ambiente, lo cual coincide con Shumaker *et al.* (1971) y Cruz y Rivera (2014), al detectar trofozoítos de esta especie en niños sanos que practicaban deportes acuáticos.

En los suelos fueron halladas especies de los géneros *Acanthamoeba* y *Vahlkampffia*. La primera es muy común en suelos, pero la segunda es más común en ambientes lacustres como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la presencia de esta es asociada en este estudio a muestras de suelo colectadas en playas o lagunas. En otras investigaciones fue posible hallar *Acanthamoeba* junto a *Hartmannella* y *Naegleria gruberi*, lo cual no se reproduce en este estudio (Sawyer *et al.* 1983; Mohaghegh *et al.* 2016); no obstante existen pocos estudios documentados en cuanto a la detección de amebas de vida libre en suelo en Latinoamérica.

Desde el punto de vista de la salud pública, este hecho de encontrar géneros y especies de amebas de vida libre en el ambiente, y especialmente en piscinas y parques recreacionales, así como en las playas; representa un riesgo para la población que visita estos sitios, como recreación y especialmente en la práctica de deportes acuáticos, debido a que en algunos de los casos, en poblaciones infantiles, y especialmente en poblaciones adultas de la tercera edad e inmunosuprimidas, puede llegar a ocasionar meningoencefalitis de origen amebiano que resulta difícil de controlar, y puede desencadenar el fallecimiento del paciente (Zamora *et al.* 2014; Pérez de Galindo 2011). Aunado a esto, se tiene que la presencia en el ambiente de estas especies de *Acanthamoeba* podría resultar en usuarios de lentes de contacto en una queratitis ocular, por contaminación de manos y sustancias relacionadas con el manejo de lentes de contacto (Alio *et al.* 2013; Yoder *et al.* 2012). *Acanthamoeba castellanii* ha sido asociada con los tejidos blandos, como los que conforman sistema ocular, por lo que se ubica a esta especie como altamente patogénica y relacionada con casos de queratitis (Gutekunst *et al.* 2014); aunque los casos de queratitis amebiana son de baja prevalencia, esta suele ser una patología difícil de curar y que en un alto porcentaje termina con procedimientos quirúrgicos (Alio *et al.* 2013).

Conclusiones

Las amebas de vida libre son más comunes de lo que creemos, no obstante en poblaciones vulnerables como niños, ancianos y personas inmuno-suprimidas, tales como los pacientes seropositivos para el VIH; el contacto con estos ambientes, principalmente los de uso recreacional para nado y deportes acuáticos, podrían ser desencadenantes de enfermedades como la meningoencefalitis, que en muchos de los casos resulta fatal; lo que tendría que llevar a tomar medidas de control con respecto al uso de estos lugares.

En este estudio la prevalencia de *Naegleria fowleri* se presentó piscinas muestreadas. Una especie que es patógena y está relacionada a casos de meningoencefalitis. Otras especies fueron detectadas en playas de Maracaibo e incluyen a *Acanthamoeba castellani*, *Acanthamoeba culbertsoni*, y *Acanthamoeba polyphaga* que están relacionadas con enfermedades de la piel, y queratitis; haciendo que estos sitios de recreación y pertenecientes al entorno de Maracaibo constituyan riesgos para la salud humana.

Agradecimientos

Trabajo de Investigación que contó con el apoyo de:

Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones Clínicas, La Universidad del Zulia, Maracaibo, Zulia, Venezuela.

Proyecto de colaboración de la Fundación Polar.

Laboratorio de Parasitología a cargo de Leonor Bonilla* (fallecida en el 2013), LUZ.

Laboratorios de Microbiología (Facultad de Ingeniería) y de Microbiología del Petróleo (Facultad Experimental de Ciencias) de la Universidad del Zulia por la infraestructura y donativos de materiales y reactivos.

Financiamiento, sin fondos que especificar, personales, donativos, reactivos y otras colaboraciones e infraestructura.

Literatura Citada

- ALIO, J., A. ABOUDA, D. VALLE, J. DEL CASTILLO AND J. FERNÁNDEZ. 2013. Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported case. *J. Ophthalmic. Inflamm. Infect.* 3:47. doi: 10.1186/1869-5760-3-47.
- BELTRÁN, E. M, AND T. N. UYEMA. 1997. Amebas de vida libre en muestras de agua de piscinas del departamento de Lima. *Rev. Med. Expo.* 14: 29-33.

- CERMEÑO, J. R., I. HERNÁNDEZ, H. E. YASIN, R. TINEDO, R. SÁNCHEZ, G. PÉREZ, R. GRAVANO, AND A. RUIZ. 2006. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Epidemiological study in Anzoátegui State, Venezuela. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39:264-268.
- CERVA, L. 1980. Laboratory Diagnosis of Primary Amoebic Meningo-Encephalitis and Methods for the Detection of Limax Amoebae in the Environment. Folia Parasitol. (Praha) 27: 1-9.
- CONZA, L., P.S. CASATI, AND V. GAIA. 2013. Presence of *Legionella* and free-living amoebae in composts and bioaerosols from composting facilities. PlosOne. 8: e68244. doi: 10.1371/journal.pone.0068244.
- CRUZ, S.A.R., AND W. L. RIVERA. 2014. Genotype analysis of *Acanthamoeba* isolated from human nasal swabs in the Philippines. Asian Pac. J. Trop. Med. 7: S74-S78.
- DE JONCKHEERE, J.F. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. Ann. Microbiol. (Paris). 130B:205-212.
- GUTEKUNST, S., C. GRABOSCH, A. KOVALEV, S. GORB, AND C. SELHUBER-UNKEL. 2014. Influence of the PDMS substrate stiffness on the adhesion of *Acanthamoeba castellanii*. Beilstein J. Nanotechnol. 5:1393-1398. doi: 10.3762/bjnano.5.152.
- KINNEAR, F. 2003. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*: quantitative & qualitative in vitro studies on keratocytes. J. Infect. 46:228-237.
- LAU, H., AND N. ASHBOLT. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. J. Appl. Microbiol. 107: 368-378.
- LEIVA, B., E. CLASDOTTER, E. LINDER, AND J. WINIECKA-KRUSNELL. 2008. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amoebae in water sources of León, Nicaragua. Rev. Biol. Trop. 56:439-46.
- MOHAGHEGH, M. A., RESKETI M. A., MOHAMMADIMANESH R., AZAMI M., MIRZAI F., FALAHATI M., JAHANI S., AND GHOMASHLOOYAN M. 2016. Soil contamination with free-living amoeba in north of Iran. Int. J. Infect. 3: e37923, DOI: 10.17795/iji-37923
- MUÑOZ, V., H. REYES, B. ASTORGA, E. RUGIERO, S. DEL RÍO, AND P. TOCHE. 1993. Amibas de vida libre en habitats de aguas dulces de Chile. Parasitol. Día. 17:147-52.
- MUÑOZ, V., H. REYES, P. TOCHE, C. CÁRCAMO AND B. GOTTLIEB. 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. Parasitol. Latinoam. 58: 106 -111.
- PAGE, F. C. 1988. A new key to fresh water and soil gymnamoebae. Cumbria England: Fresh water Biological Association, UK.
- PÉREZ DE GALINDO, M V. 2011. Amibas de vida libre *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, *Sappinia* y *Paravahlkampfia*: agentes de infección en humano y transmisoras de microorganismos. Rev. Fac. Med. (Caracas). 34:9-18.

- PERTUZ-BELLOSO, S. B., AND E. RAMÍREZ. 2014. Caracterización de la fagocitosis en cepas de *Acanthamoeba*. Fagocitosis en *Acanthamoeba castelani*, y *Acanthamoeba* sp. Verlag/Editorial: Editorial Académica Española, Deutschland, Alemania.
- PERTUZ-BELLOSO, S., E. RAMÍREZ-FLORES, AND M. MACEK. 2003. Phagocytosis of *Acanthamoeba* sp from aquifer of the Valley of Mezquital (State of Hidalgo, Mexico). Pp. 129-136, in Lares-Villa, G.C. Booton and F. Mariano-Cabral (ed.), Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México.
- PERTUZ-BELLOSO, S., M. MACEK, AND E. RAMÍREZ-FLORES. 2002. Caracterización de la fagocitosis de *Acanthamoeba culbetsoni* y *Acanthamoeba* sp. usando *Enterobacter aerogenes* marcada fluorescentemente. Rev. Latinoam.Microbio 44:499.
- PETIT, F., V. VÍLCHEZ, G. TORRES, O. MOLINA, S. DORFMAN, E. MORA, AND J. CARDOZO. 2006. Meningoencefalitis Amebiana Primaria Comunicación de dos nuevos casos Venezolanos. Arq. Neuropsiquiatr. 64:1043-1046.
- SAWYER, T., T. NARAD, E. LEWIS, AND S. MCLAUGHLIN. 1993. *Acanthamoeba stevensoni* sp. (Protozoa: Amoebida) from sewage-contaminated shellfish beds in Raritan Bay, New York. J. Euk. Microbiol. 40: 742-746.
- SHUMAKER, J., G. HEALY, D. ENGLISH, AND M. SHUTTZ. 1971. *Naegleria gruberi*: isolation from nasal swab of a healthy individual. The Lancet. 2: 602-603.
- WHEAT, W., A. ASALI, V. THOMAS, J. SPENCER, R. LAHIRI, D. WILLIAMS, G. MCDONNELL, M. GONZALEZ-JUARRERO, P. BRENNAN, AND M. JACKSON. 2014. Long-term Survival and Virulence of *Mycobacterium leprae* in Amoebal Cysts. PLoS Negl. Trop. Dis. 8: e3405. doi:10.1371.
- YODER, J., J. VERANI, N. HEIDMAN, J. HOPPE-BAUER, E. C. ALFONSO, D. MILLER, D. JONES, D. BRUCKNER, R. LANGSTON, B. JENG, C. JOSLIN, E. TU, K. COLBY, E. VETTER, D. RITTERBAND, W. MATHERS, R. KOWALSKI, N. ACHARYA, A. LIMAYE, C. LEITER, S. ROY, S. LORICK, J. ROBERTS, AND M. BEACH. 2012. *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. Ophthalmic. Epidemiol. 19:221-225. doi: 10.3109/09286586.
- ZAMORA, A., H. HENDERSON, AND E. SWIATLO. 2014. *Acanthamoeba* encephalitis: A Case Report and Review of Therapy. Surg. Neurol. Int. 5: 68. doi:10.4103/2152-7806.132239.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol.50 N° 2_____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en agosto de 2016, por el **Fondo Editorial Serbiluz**,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve