

PARÁSITOS DE TRANSMISIÓN HIDRICA

AMEBAS DE VIDA LIBRE COMO PATÓGENOS OPORTUNISTAS

Dra. María Reyes-Batlle / Dr. Jacob Lorenzo-Morales



AMEBAS DE VIDA LIBRE (AVL)



- Tanto la fase de trofozoíto o fase vegetativa, como la fase quística de este grupo de protozoos con capaces de sobrevivir en el ambiente o colonizar tejidos.
- Por ello se consideran **PATÓGENOS OPORTUNISTAS**, ya que no son parásitos obligados
- Esta doble condición hace que se les denomine **ANFIZOICOS**
- El aumento de casos en los últimos años y su amplia de distribución en ambientes de estrecho contacto con los seres humanos ha hecho que el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, EEUU (CDC) ha pasado a reconocerlos como **PATÓGENOS EMERGENTES**

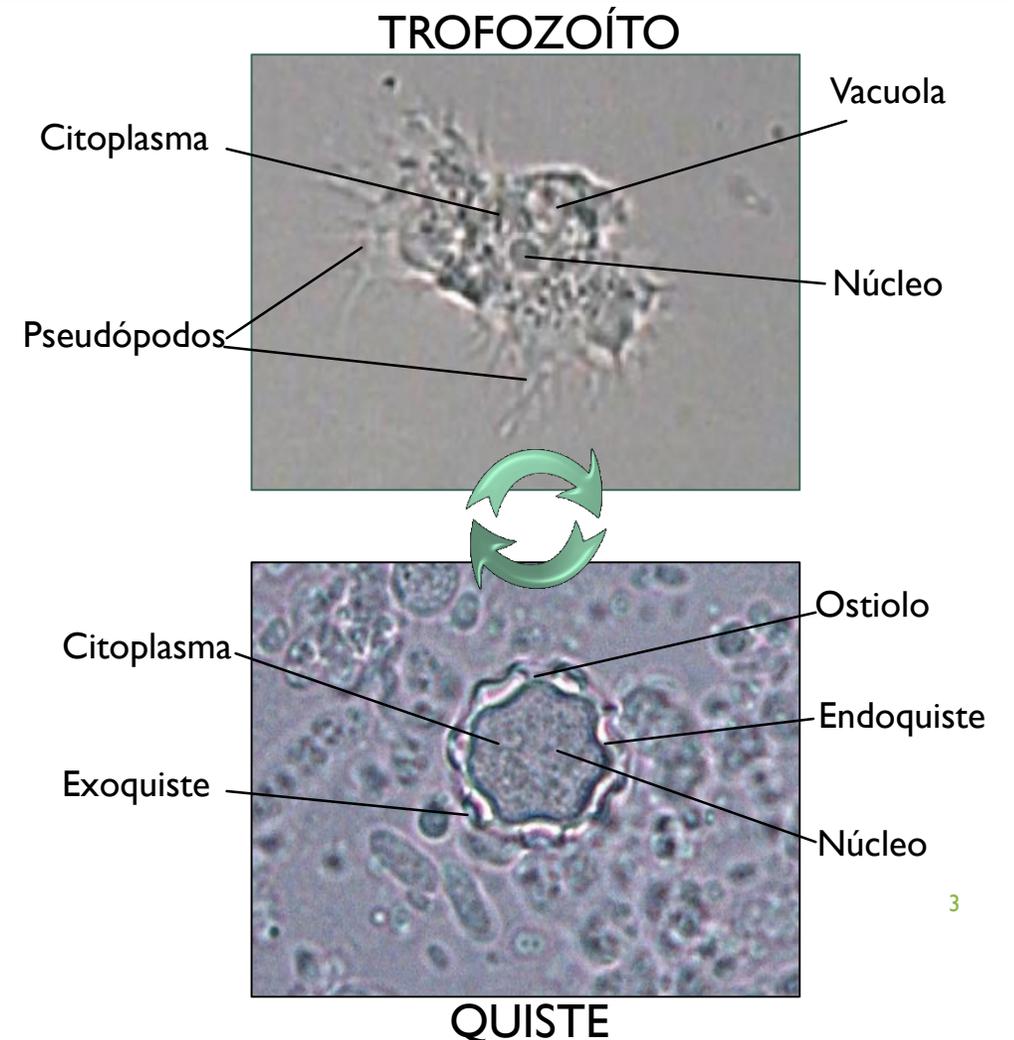


**PROTOZOOS
EMERGENTES**

AMEBAS DE VIDA LIBRE (AVL)

CICLO DE VIDA

- La mayoría de las AVL cuentan con un ciclo de vida sencillo que consta de dos estadios: TROFOZOÍTO y QUISTE
- El trofozoíto es la forma vegetativa del parásito, con la que lleva a cabo todas las funciones vitales:
 - Movimiento
 - Alimentación
 - Reproducción
- El quiste es la forma de resistencia. El parásito la adquiere cuando las condiciones del medio son desfavorables, y es reversible en cuanto estas condiciones mejoren
- Existen AVL que no se le conoce fase quística o que cuentan con un tercer estadio flagelado, como especies de la Familia Vahlkampfiidae, por ejemplo la conocida *Naegleria fowleri*



CLASIFICACIÓN DE LAS AVL

En los primeros años de estudio, las principales clasificaciones se basaban en dos aspectos:

ASPECTOS MORFOLÓGICOS

- Morfología trofozoítos y quistes
- Morfología y número de núcleos en trofozoítos y quistes
- Presencia/Ausencia estructuras flagelares
- Presencia/Ausencia estructuras intracelulares

ASPECTOS FISIOLÓGICOS

- Movilidad
- Osmotolerancia/Termotolerancia

Però los investigadores se dieron cuenta de que estas características estaban **CONDICIONADAS** por las **CONDICIONES** del CULTIVO (H^a, T^a, ...)

Gracias a los avances en la **BIOLOGÍA MOLECULAR** comenzaron a utilizarse herramientas como la PCR para clasificar a las AVL en función de su secuencia de nucleótidos. Estas clasificaciones se basan en las secuencias que comprenden:

- Secuencia del ARNr 18S: secuenciación del gen completo para agrupar a las AVL de manera general
 - Fragmento DF3, incluido dentro del 18S: concretamente para el género *Acanthamoeba*, que lo divide en 22 genotipos
- Secuencia del ARNr 16S: secuenciación del gen completo para identificar a la especie *Balamuthia mandrillaris*
- Secuencia del ARNr 5,8S y las ITS flanqueantes para identificar diferentes genotipos de la especie *N. fowleri*

SUBJETIVIDAD

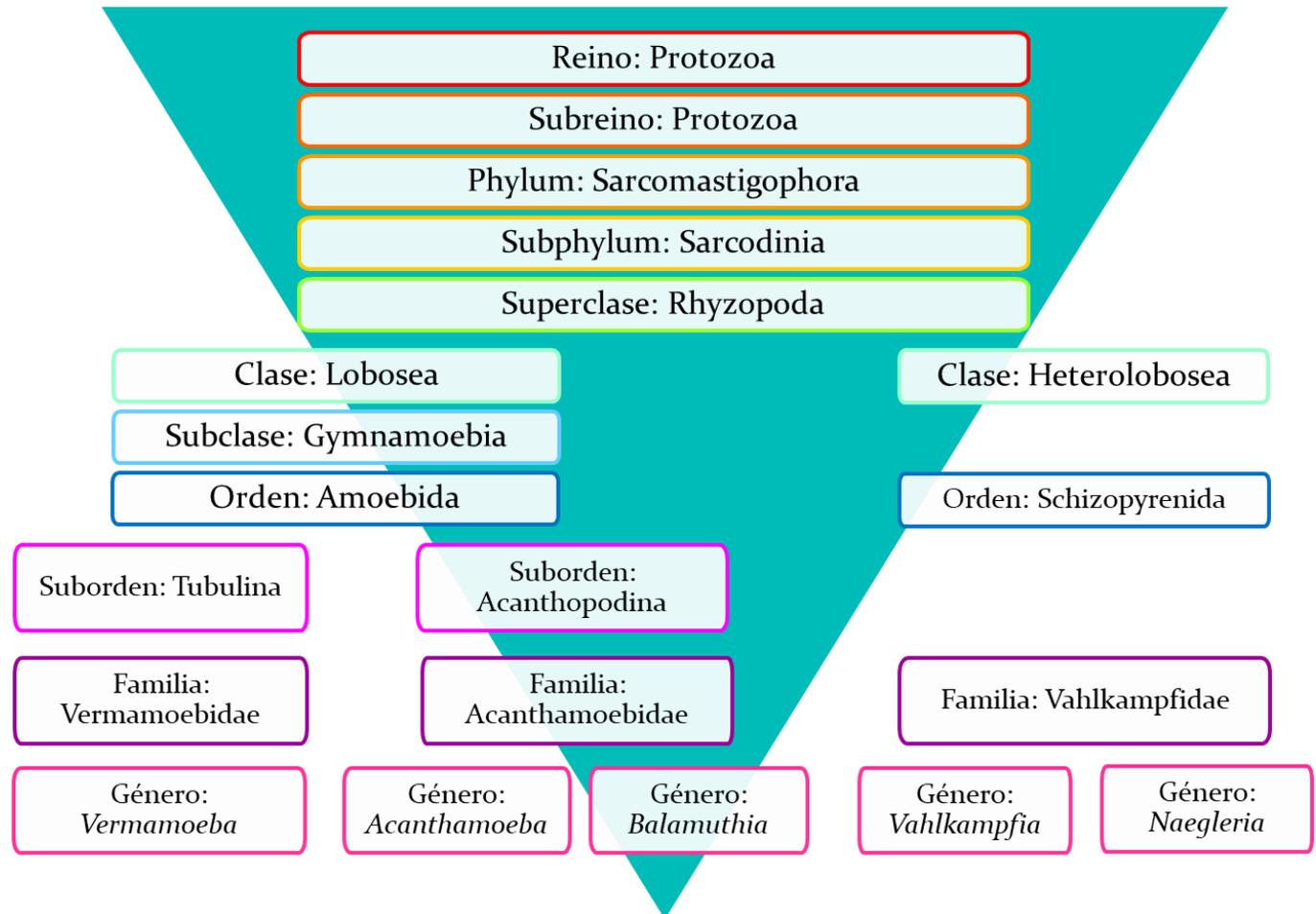
OBJETIVIDAD

CLASIFICACIÓN DE LAS AVL

En el presente esquema hemos representado como quedarían clasificados los principales grupos patógenos de AVL:

- *Vermamoeba vermiformis*
- Género *Acanthamoeba*
- *Balamuthia mandrillaris*
- Género *Vahlkampfia*
- *Naegleria fowleri*

V. vermiformis, *Acanthamoeba* spp. y *N. fowleri* son las AVL más frecuentemente encontradas en cuerpos de agua, y en las que nos centraremos en este tema



AMEBAS DE VIDA LIBRE (AVL) PATÓGENAS

Acanthamoeba spp

- Es el género de AVL más abundante en la naturaleza y el que más comúnmente se encuentra en muestras clínicas
- Su nombre viene del griego “*acanth*” que significa “espinas”, ya que sus pseudópodos con espinosos
- La secuenciación del fragmento DF3 de ARNr 18S ha permitido hasta el momento la descripción de 22 variantes o genotipos (T1-T22)
- El genotipo T4 es el causante de la mayoría de las infecciones producidas por este género y el más abundante en la naturaleza
- Patologías que produce
 - Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) y afecciones cutáneas en pacientes inmunodeprimidos
 - Queratitis por *Acanthamoeba* (QA) en pacientes inmunocompetentes



Pseudópodos espinosos

- EGA: enfermedad rara que lleva a la muerte a la mayor parte de los afectados. En el cerebro se produce un edema severo acompañado de una necrosis hemorrágica

<https://neurologyindia.com/article.asp?issn=0028-3886;year=2016;volume=64;issue=1;spage=101;epage=104;aulast=Thamtam;type=3>

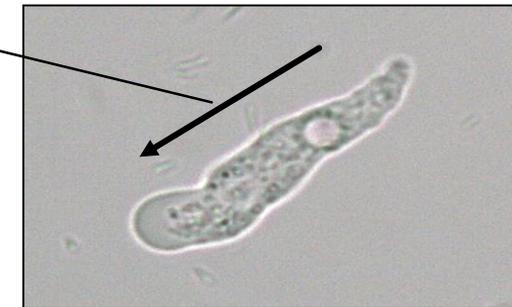
- QA: afección de la córnea en la que la ameba penetra en las diferentes capas y degrada los tejidos, pudiendo llegar al estroma ocular y, si no es eliminada rápidamente, pudiendo producir ceguera o enucleación

https://www.researchgate.net/publication/320177212_Associated_factors_diagnosis_and_management_of_Acanthamoeba_keratitis_in_a_referral_Center_in_Southern_China

Vermamoeba vermiformis

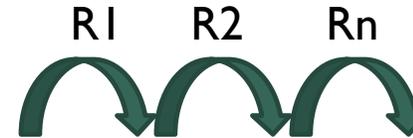
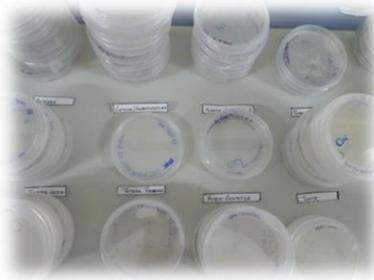
- Anteriormente conocida como *Hartmannella vermiformis*, pero en 2011 (Smirnov et al., 2011) se creó una nueva Familia Vermamoebidae y el género *Vermamoeba*, con una única especie
- Su nombre deriva de la palabra latina “verme”, que significa “gusano”, ya que su movimiento consiste en la proyección de un único pseudópodo frontal dominante que hace que su movimiento se parezca al de un gusano
- Patologías que produce
 - Queratitis
 - Lesiones cutáneas
 - Encefalitis
- Esta ameba no es sólo peligrosa por las patologías que produce sino porque es capaz de transportar otros microorganismos patógenos como *Legionella pneumophila*, que así evadirán los sistemas típicos de desinfección habituales, a los que estas amebas son altamente resistentes gracias a su fase quística

Dirección de desplazamiento



- Caso de queratitis:
 - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24454444/>
- Caso de encefalitis:
 - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8987199/>
- Caso de lesión cutánea
 - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30972570/>

AISLAMIENTO DE AVL EN MUESTRAS DE AGUA



Como ya hemos visto, las AVL presentes en agua podrían representar un riesgo para la salud humana. Por lo tanto, es importante la labor de detección de estos protozoos parásitos en las aguas con las que tenemos un estrecho contacto, como son las aguas de piscinas, de mar, de escorrentía o de abasto.

El proceso a seguir sería el siguiente:

1. Tomar la muestra de agua y mantenerla refrigerada hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio
2. Filtrar esta agua a través de una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de $0,45\mu\text{m}$, que retendrá a las AVL patógenas
3. Al acabar de filtrar todo el agua del que disponemos sembraremos la membrana boca abajo en una placa de Petri con Agar No Nutritivo (ANN), donde crecen las AVL e inhibiremos el crecimiento de la mayoría de otros microorganismos. Las placas las incubamos a temperatura ambiente (donde crecen la mayoría de las AVL) y deben estar selladas para evitar la desecación o la contaminación externa
4. Diariamente monitorizaremos con ayuda de un microscopio y allí donde veamos que existe crecimiento amebiano recortamos el agar y lo sembramos de nuevo boca abajo en una nueva placa de ANN. Este paso lo repetimos hasta que obtengamos un solo tipo morfológico de AVL en nuestro cultivo
5. Una vez tengamos una AVL aislada llevaremos a cabo la extracción de su ADN para su caracterización molecular e intentaremos cultivarla de manera aislada o axénica en medio líquido para futuros experimentos

AISLAMIENTO DE AVL EN MUESTRAS CLÍNICAS

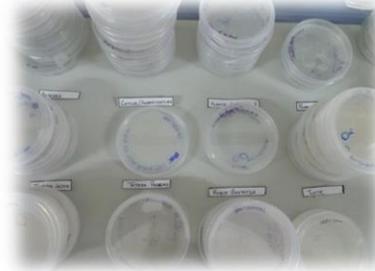
TOMA DE MUESTRA

Encefalitis

- Biopsia
- Análisis del LCR

Queratitis

- Raspado/Exudado
- Test de Schirmer



Como ya hemos visto las AVL pueden transmitirse a través de los medios acuosos y llegar a colonizar tejidos. El análisis de las aguas nos sirve como método de prevención, pero si ya se encuentran produciendo una infección también es importante su detección para un diagnóstico precoz. Los métodos de detección más comunes son los siguientes:

- **Biopsia del tejido infectado.** En la mayoría de los pacientes de encefalitis esta pasa a ser Necropsia, ya que el diagnóstico es desgraciadamente postmortem
- Análisis del **líquido cefalorraquídeo (LCR)**
- **Raspado / exudado corneal.** El raspado está considerado como invasivo y lesivo para los pacientes
- En los últimos años se ha demostrado que el uso del **Test de Schirmer** ([Rocha-Cabrera, et al., 2015](#)), el cual mide la producción de lágrima, puede ser un método efectivo a la hora de detectar AVL en la superficie ocular. Es un método no invasivo y menos lesivo para el paciente

La muestra se inocular directamente en el ANN y una vez aislada la AVL causante de la infección el proceso de caracterización es el mismo que en el caso de las AVL aisladas de muestras de agua

BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS

Actualmente no existe ningún tratamiento establecido ni 100% efectivo para las infecciones causadas por AVL

Los tratamientos usados actualmente para las principales infecciones por VAL son:

ENCEFALITIS

- Entre todas, las producidas por *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris* y *N. fowleri*, tienen más de un 90% de mortalidad

- Los tratamientos más usados son:

- Ketoconazol
- Fluconazol
- Sulfadiazina
- Pentamidina
- Isetionato
- Anfotericina B
- Azitromicina
- Itraconazol
- Rifampicina

QUERATITIS

- La incidencia es de 1-9 entre 100.000 habitantes (N° ORPHA67043)

- El 85 %-88 % de casos esta conectado con el uso de lentes de contacto

- De 400 a 800 de cada 10.000 estuches de lentillas están colonizadas por amebas

- Los tratamientos más usados son:

- Biguanidas (PHMB)
- Clorhexidina
- Voriconazol
- Estatinas

DESVENTAJAS: no efectivos en todos los pacientes, efectos secundarios, tóxicos y prolongados en el tiempo

BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS

Dentro de la comunidad científica existe una búsqueda activa de nuevos tratamientos

- Para la búsqueda de nuevos tratamientos debemos comenzar con los experimentos *in vitro*
- Para ello necesitamos un cultivo axénico o puro de una AVL determinada
- Debemos buscar que el tratamiento cumpla lo siguiente:
 - Activo para la fase de trofozoíto
 - Activo para la fase quística
 - Reducir al mínimo los efectos adversos
 - Baja toxicidad
 - Baja respuesta inflamatoria. Buscamos tratamientos que produzcan una muerte del parásito mediante la ruta apoptótica, la cual no genera una respuesta inflamatoria

