

Cultivo de *Acanthamoeba* spp. en agua apirógena

► María del Carmen Rojas^{1a*}, Pablo Mauricio Vázquez^{2a}, Sixto Raúl Costamagna^{3b}

¹ Licenciada en Ciencias Biológicas, Doctora en Biología.

<https://orcid.org/0000-0002-3623-1156>

² Ingeniero Agrónomo, MSc. en Producción Vegetal.

<https://orcid.org/0000-0002-9405-766X>

³ Bioquímico, Máster internacional en enfermedades parasitarias tropicales, Doctor en Bioquímica.

<https://orcid.org/0000-0001-8358-6155>

^a Estación Experimental Agropecuaria Guillermo Covas, INTA-Anguil. RN. 5 km 580. CP 6326, Anguil, La Pampa, Argentina.

^b Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Cátedra de Parasitología Clínica, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina (Ex Profesor).

* Autora para correspondencia.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el cultivo de cepas de *Acanthamoeba* spp. en agua destilada estéril apirógena de uso farmacéutico. Se utilizaron dos cepas de genotipo T4 [un aislamiento de encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y una ambiental] y cepas correspondientes a los genotipos T5 y T15. Los quistes de cada una de las cepas se sembraron en placas de Petri con agar no nutritivo con diferentes soluciones (agua destilada estéril apirógena uso médico para preparaciones inyectables, agua destilada filtrada, medio Page) y combinados con suspensiones de *Escherichia coli*. Las placas se incubaron a 37 °C y se monitorearon diariamente durante 15 días para la detección de trofozoítos. El crecimiento se evaluó mediante examen microscópico directo. Cada cultivo contó con cuatro repeticiones para cada una de las cepas (n=96). En conclusión, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las cepas por día. Las cepas T5 y T4 (encefalitis amebiana granulomatosa) desarrollaron mayor cantidad de trofozoítos en el primer día respecto de la cepa T15 (H=16,42; p=0,001). En el agua apirógena con *E. coli* se obtuvo un crecimiento igual a la solución de Page con *E. coli* (H=24,64; p=0,0001). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de trofozoítos obtenidos en agua apirógena con *E. coli* y solución de Page con *E. coli* en la cepa T4 (EGA) (U=4; p<0,05) pero sí en la cepa T4 ambiental (U=0; p<0,05).

Palabras clave: *Acanthamoeba* spp.; Cultivo; Agua destilada estéril apirógena

Acanthamoeba spp. culture in pyrogen-free water

Abstract

The objective of this study was to evaluate the culture of strains of *Acanthamoeba* spp. in sterile apyrogenic distilled water for pharmaceutical use. Two T4 genotype strains [one isolate of granulomatous amebic encephalitis (GAE) and one environmental], a T5 and T15 genotype strains were used. The cysts of each of the strains were seeded in Petri dishes with non-nutritive agar with different solutions (pyrogenic sterile distilled water for medical use for injectable preparations, filtered distilled water, Page medium) and combined with *Escherichia coli* suspensions. Plates were incubated at 37 °C and monitored daily for 15 days for the detection of trophozoites. Growth was assessed by direct microscopic examination. Each medium culture counted four replicates for each of the strains (n=96). Concluding, statistically significant differences were found in the growth of the strains per day. Strains T5 and T4 (granulomatous amebic encephalitis) developed a greater number of trophozoites on the first day compared to strain T15 (H=16.42; p=0.001). In apyrogenic water with *E. coli*, a growth equal to

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)

Page's solution with *E. coli* was obtained ($H=24.64$; $p=0.0001$). No statistically significant differences were found in the amount of trophozoites obtained in apyrogenic water with *E. coli* and Page's solution with *E. coli* in strain T4 (GAE) ($U=4$; $p<0.05$), but significant differences were found in the environmental T4 strain ($U=0$; $p<0.05$).

Keywords: *Acanthamoeba* spp.; Culture; Sterile apyrogenic distilled water

Cultura de *Acanthamoeba* spp. em água apirogênica

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo de cepas *Acanthamoeba* spp. em água destilada apirogênica estéril para uso farmacêutico. Foram utilizadas duas cepas de genótipo T4 [um isolamento de encefalite granulomatosa amebiana (EGA) e uma ambiental], e cepas correspondentes aos genótipos T5 e T15. Os cistos de cada uma das cepas foram semeados em placas de Petri com ágar não nutritivo com diferentes soluções (água destilada estéril apirogênica para uso médico para preparações injetáveis, água destilada filtrada, meio Page) e combinados com suspensões de *Escherichia coli*. As placas foram incubadas a 37 °C e monitoradas diariamente durante 15 dias para detecção de trofozoítos. O crescimento foi avaliado através de exame microscópico direto. Cada cultura contou com quatro réplicas para cada uma das cepas ($n=96$). Em conclusão, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas no crescimento das cepas por dia. As cepas T5 e T4 (encefalite amebiana granulomatosa) desenvolveram maior número de trofozoítos no primeiro dia em relação à cepa T15 ($H=16,42$; $p=0,001$). Em água apirogênica com *E. coli*, foi obtido crescimento igual ao da solução de Page com *E. coli* ($H=24,64$, $p=0,0001$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de trofozoítos obtidos em água apirogênica com *E. coli* e solução de Page com *E. coli* na cepa T4 (EGA) ($U=4$; $p<0,05$), mas sim na cepa T4 ambiental ($U=0$; $p<0,05$).

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp.; Cultura; Água destilada apirogênica estéril

Introducción

El género *Acanthamoeba* pertenece a un grupo de protozoos ubicuos y de vida libre que se encuentran en el ambiente y se pueden aislar de una variedad de hábitats (1) (2) (3) (4). El estudio de *Acanthamoeba* resulta de interés para la salud pública debido a que causa patologías como encefalitis granulomatosa amebiana (EGA), queratitis por *Acanthamoeba* (QA), lesiones cutáneas, infecciones de senos nasales y neumonía (5) (6) (7) (8) (9). Su plasticidad y capacidad de adaptación son de interés para el diseño de modelos celulares complejos (10) (11). También las relaciones endosimbióticas de este protozoo pueden incrementar su propia virulencia y la de sus endosimbiontes (12). Los medios de agar no nutritivo (ANN) con una suspensión de *Escherichia coli* en solución de Page (monoxénico) y peptona-levadura-glucosa (PYG) (axénico) se han introducido como medios estándares de cultivo para *Acanthamoeba* spp. (13) (14) (15). Otros medios son utilizados para la obtención de trofozoítos o quistes (16) (17) (18) (19) (20). El cultivo axénico se presenta como una alternativa sencilla pero no siempre exitosa debido a que algunos aislados de *Acanthamoeba* spp. no crecen bajo esta condición (21).

Los períodos prolongados en estos tipos de medios afectan la capacidad de enquistamiento (22) pero no al desarrollo poblacional de los trofozoítos necesarios para llevar a cabo pruebas de sensibilidad a fármacos, obtención de antisueros, estudio de vacunas o desarrollo de pruebas de diagnóstico (18). En el área de la salud pública humana, el diagnóstico correcto debe insumir el menor tiempo posible. Contar con un medio de cultivo estandarizado, esterilizado y disponible comercialmente reduce el tiempo de preparación de soluciones, acorta el tiempo de diagnóstico y agiliza la implementación de un tratamiento adecuado. En este trabajo se evaluó la posibilidad de cultivar cepas patógenas y ambientales de *Acanthamoeba* spp. en agua destilada estéril apirógena de uso farmacéutico, con el objetivo de reducir costos y tiempo de cultivo, tan necesarios para el diagnóstico en seres humanos.

Materiales y Métodos

Cepas de *Acanthamoeba* spp.

Se utilizaron cuatro cepas secuenciadas de *Acanthamoeba* spp., una de genotipo T4, proveniente de un ais-

lamiento de EGA (23) y las restantes tres eran de genotipos ambientales: T4, T5 y T15 (4). Los trofozoítos se obtuvieron de cultivos realizados en placas de Petri (50 mm de diámetro y 14,2 mm de altura) con agar no nutritivo (ANN), cubiertos con 500 µL de una suspensión de *Escherichia coli* en medio Page como nutriente para el protozoo. El crecimiento se evaluó mediante examen microscópico directo. Las placas se incubaron a 37 °C y se monitorearon diariamente durante 15 días para la detección de trofozoítos. Finalizada la etapa de crecimiento, las placas con quistes se dejaron secar durante 30 días en estufa a 37 °C.

Recolección de quistes de placas con agar no nutritivo (ANN) deshidratado

Las placas con los protozoos enquistados fueron humedecidas con 1000 µL de agua de calidad molecular libre de nucleasas (Biodynamics); se dejó hidratar el agar y luego se procedió a raspar suavemente con ansa. El líquido fue colectado y se volvió a colocar en la placa, con el fin de arrastrar la mayor cantidad de quistes para obtener mayor concentración, procedimiento que se repitió cinco veces.

Concentración de los quistes

Todos los quistes obtenidos, separados por aislamiento, se colocaron en tubos cónicos con 10 mL de solución de Page. Las muestras se lavaron cuatro veces, tres lavados se realizaron con solución de Page durante 2 min a 12 000 r.p.m. y el último con agua de calidad molecular libre de nucleasas (Biodynamics) durante 5 min a 15 000 r.p.m. La finalidad de los lavados fue eliminar restos de bacterias. Se verificó la concentración de quistes viables de cada aislamiento mediante tinción (azul tripán al 0,4%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) por recuento en cámara de Neubauer.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Se utilizaron placas de Petri con ANN. Los quistes fueron sembrados en diferentes soluciones (tratamientos) combinados o no con suspensiones de *E. coli*:

- agua destilada estéril apirógena (de uso médico para preparaciones inyectables)
- agua destilada estéril apirógena con suspensión de *E. coli*
- agua destilada filtrada (filtro 0,22 µm)
- agua destilada filtrada (filtro 0,22 µm) con suspensión de *E. coli*
- medio Page: NaCl 120 mg; MgSO₄·7H₂O 4 mg; CaCl₂·2H₂O 4 mg; Na₂HPO₄ 142 mg; KH₂PO₄ 136 mg; H₂O destilada c.s.p. 1000 mL. (13)
- Como control se utilizó el medio Page con suspensión de *E. coli* (13)

Las placas fueron incubadas a 37 °C y monitoreadas diariamente durante 15 días. Cada uno de los tratamientos y sus respectivas suspensiones tuvieron 4 repeticiones para cada una de las cepas (n=96). Dado que los resultados no presentaban distribución normal, las comparaciones se realizaron utilizando las pruebas de Kruskal-Wallis por rangos y Mann-Whitney ($p<0,05$). Se categorizó de 1 a 4 el crecimiento de las cepas considerando el porcentaje (1-sin crecimiento, 2-hasta el 25% de crecimiento en placa, 3-hasta el 75% de crecimiento en placa, 4-100% de crecimiento en placa).

Resultados

Se verificó la presencia de trofozoítos durante el primer día de cultivo en el 50% (48/96) de las placas de Petri. La prueba de Kruskal-Wallis registró diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las cepas por día (Tabla I). Durante el primer día las cepas T4 y T5 (EGA) desarrollaron una mayor cantidad de trofozoítos respecto de la cepa T15 (H=16,42; $p=0,001$) (Tabla I). A partir del tercer día no se observaron diferencias entre las cepas (H=4,17; $p=0,18$).

Tabla I. Crecimiento de cepas de *Acanthamoeba* spp. por día

Días	Cepas	Rango	Grupo (*)
1	T15	32,29	A
	T4	41,27	AB
	T5	55,79	ABC
	T4(EGA)	64,65	C
2	T4	36,94	A
	T15	42,81	AB
	T4(EGA)	55,73	B
	T5	58,52	B

(*) indican grupos diferentes.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto de las suspensiones y soluciones utilizadas como medios de cultivo (Tabla II). Durante el primer y el segundo día con el agua apirógena más *E. coli* y con la suspensión de Page más *E. coli* se obtuvo la mayor cantidad de trofozoítos (H=16,42; $p=0,0008$; H=21,31; $p=0,0003$, respectivamente). Se cuantificó la cantidad de trofozoítos obtenidos con las dos mejores suspensiones (agua apirógena con *E. coli* y Page con *E. coli*) con amebas del genotipo T4 (ambiental y EGA). La prueba de Mann-Whitney no registró diferencias estadísticamente significativas para la cepa T4 (EGA) (U=4; $p<0,05$) pero sí se hallaron diferencias significativas para la T4 (ambiental) (U=0; $p<0,05$).

Tabla II. Medios de cultivos utilizados para el crecimiento de *Acanthamoeba* spp.

Día	Medios	Rango	Grupo
1	Solución de Page	33,94	A
	Agua filtrada + <i>E. coli</i>	36,41	A
	Agua filtrada	41,34	AB
	Agua apirógena	58,19	BC
	Agua apirógena + <i>E. coli</i>	59,56	BC
	Sol. Page + <i>E. coli</i> (control)	61,56	C
2	Agua filtrada	34,72	A
	Agua filtrada + <i>E. coli</i>	37,22	A
	Agua apirógena	42,69	A
	Sol. Page	43,75	AB
	Agua apirógena + <i>E. coli</i>	62,75	BC
	Sol. Page + <i>E. coli</i> (control)	69,88	C

(*) indican grupos diferentes.

Discusión y Conclusiones

En este estudio se observó que *Acanthamoeba* spp. crece muy bien en ANN con una suspensión de agua destilada estéril apirógena y un tapiz de *E. coli* y se puede obtener un rendimiento similar o mejor al correspondiente al medio de referencia (suspensión de Page con *E. coli*) según se trate de una cepa patógena o ambiental. El agua destilada estéril apirógena es un producto disponible en el área de la salud humana y su utilización como una solución destinada para medio de cultivo reduce el tiempo, costos y la exigencia de contar con un medio exclusivo para *Acanthamoeba* spp. La complejidad en la preparación de otros medios de cultivo que también resultan exitosos dificulta su utilización en los laboratorios de diagnóstico clínico (19). El agua destilada estéril apirógena con un tapiz de *E. coli* favoreció el crecimiento de todos los genotipos estudiados, excepto el de la cepa T15, que presentó la menor tasa de crecimiento. Esto pudo deberse a que muchas cepas de *Acanthamoeba* no responden bien en condiciones de laboratorio (19) (24). Existen estudios que proporcionaron información satisfactoria sobre los medios de cultivo y aislamiento para *Acanthamoeba* spp. pero que requieren diferentes reactivos, insumen tiempo de preparación o necesitan equipamiento no disponible en todos los laboratorios (14) (15) (16) (18) (19). La cantidad de trofozoítos obtenidos con la suspensión de *E. coli* en agua destilada estéril apirógena permitió la determinación morfológica y también resultó óptima para la realización de estudios posteriores (p. ej. PCR). Si bien existe una diversidad de medios de cultivo (20), los autores de este trabajo consideran que al

momento del diagnóstico clínico la utilización del agua apirógena con *E. coli* resulta ser un protocolo accesible, aplicable, sencillo, rápido, reproducible y económico. Se concluye que el agua estéril apirógena, que se utiliza en el área de la salud humana, suplementada con *E. coli* resulta una suspensión óptima para el crecimiento de *Acanthamoeba* spp., representa una alternativa rápida y económica para el diagnóstico y evita preparar la solución de Page, ya que no todos los laboratorios disponen de las drogas necesarias.

Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin una financiación específica.

Conflictos de intereses

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

Correspondencia

Dra. MARÍA DEL CARMEN ROJAS

Estación Experimental Agropecuaria Guillermo Covas

INTA-Anguill. RN. 5 km 580.

CP 6326, Anguill, La Pampa, Argentina.

Correo electrónico: rojas.maria@inta.gob.ar

Referencias bibliográficas

- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. 1ra. ed. Poole, Great Britain: Caister Academic Press; 2009.
- Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. Parasitol Res 2014 Sep; 113 (9): 3151-8.
- Khurana S, Biswal M, Kaur H, Malhotra P, Arora P, Megha K, *et al.* Free living amoebae in water sources of critical units in a tertiary care hospital in India. Indian J Med Microbiol 2015 Jul-Sep; 33 (3): 343-8.
- Rojas MDC, Rodríguez Fermepin M, Gracia Martínez F, Costamagna SR. Presencia de *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. Rev Argent Microbiol 2017 Jul-Sep; 49 (3): 227-34.
- Galarza C, Ramos W, Gutierrez EL, Ronceros G, Teran M, Uribe M, *et al.* Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. Int J Dermatol 2009 Dec; 48: 1324-9.
- Brondfield MN, Reid MJ, Rutishauser RL, Cope JR, Tang J, Ritter JM, *et al.* Disseminated *Acanthamoeba* infection in a heart transplant recipient treated successfully with a miltefosine-containing regimen: case report and review of the literature. Transpl Infect Dis 2017 Apr; 19 (2): 10.1111/tid.12661.

7. Casero RD, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teherán A, *et al.* Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol* 2017 Oct; 54: 170-5.
8. Rodríguez-Pérez EG, Escandón-Vargas K, Ancer A. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* sp. in an immunocompetent Mexican adult. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017 May-Jun; 50 (3): 432.
9. Kot K, Łanocha-Arendarczyk N, Kosik-Bogacka D. Immunopathogenicity of *Acanthamoeba* spp. in the brain and lungs. *Int J Mol Sci* 2021 Jan 27; 22 (3): 1261.
10. Balczun C, Scheid PL. Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses* 2017 Apr 1; 9 (4): 65.
11. Baig AM. Can neurotropic free-living amoeba serve as a model to study SARS-CoV-2 pathogenesis? *ACS Chem Neurosci* 2020 Nov18; 11 (22): 3697-700.
12. Siddiqui R, Khan NA. War of the microbial worlds: who is the beneficiary in *Acanthamoeba* bacterial interactions? *Exp Parasitol* 2012 Apr; 130 (4): 311-3.
13. Page F. An illustrated key too freshwater and soil amoeba. Ambleside, England: Titus Wilson & Son, Ltd.; 1976.
14. Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology*. 5ta ed. Washington DC: American Society of Microbiology; 2007.
15. Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf* 2010 Apr 8 (2): 70-9.
16. Coulon C, Dechamps N, Meylheuc T, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. The effect of *in vitro* growth conditions on the resistance of *Acanthamoeba* cysts. *J Eukaryot Microbiol* 2012 May-Jun; 59 (3): 198-205.
17. Martín-Pérez T, Criado-Fornelio A, Ávila-Blanco M, Pérez-Serrano J. New advances in the biology of *Acanthamoeba* spp. (Protozoa: Amoebozoa): an opportunistic pathogen found in contact lenses. Arno F, Rein E, editors. New York, EE.UU: Editorial Nova Science; 2017.
18. Megha K, Gupta A, Sehgal R, Khurana S. An improvised medium for axenic cultivation of *Acanthamoeba* spp. *Indian J Med Microbiol* 2017 Oct-Dec; 35 (4): 597-9.
19. Martín-Pérez T, Criado-Fornelio A, Ávila-Blanco M, Pérez-Serrano J. Development and optimization of new culture media for *Acanthamoeba* spp. (Protozoa: Amoebozoa). *Eur J Protistol* 2018 Jun; 64: 91-102.
20. Latifi A, Salimi M. Growth comparison of *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 in several culture media. *Heliyon* 2020 Sep 14; 6 (9): e04805.
21. Schuster FL. Cultivation of opportunistic and free-living amoebas. *Clin Microbiol Rev* 2002 Jul; 15 (3): 342-54.
22. Köhler M, Leitsch D, Fürnkranz U, Duchêne M, Aspöck H, Walochnik J. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol Res* 2008 Apr; 102 (5): 1069-72.
23. Tello Brogiolo N, Molina N, Esposto S, Magistrello P, Bustamante J, D'Agustini M. Encefalitis amebiana granulomatosa por amebas de vida libre en un paciente pediátrico. *Rev Argent Neurocir (Supl. Pediatría)* 2020; 1 (1): S47-51.
24. De Jonckheere JF. Growth characteristics, cytopathic effectin cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 1980 Apr; 39 (4): 681-5.

Recibido: 26 de junio de 2023

Aceptado: 2 de agosto de 2023