

# Presencia de *Acanthamoeba* spp. en piscinas recreativas al aire libre de la ciudad de Córdoba, Argentina

► Micaela Jaule<sup>1a</sup>, María Belén Avellaneda<sup>1a</sup>, Macarena Funes-Chabán<sup>2b</sup>, Vanina Natalia Marini<sup>3a</sup>, Jerónimo Laiolo<sup>1a,b\*</sup>

<sup>1</sup> Bioquímico/a.

<sup>2</sup> Bioquímica. Doctora en Bioquímica.

<sup>3</sup> Bioquímica. Doctora en Ciencias Biológicas.

<sup>a</sup> Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Instituto de Recursos Naturales y Sustentabilidad. José Sánchez Labrador S.J. (IRNASUS-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

\* Autor para correspondencia.

## Resumen

El objetivo del estudio fue determinar la presencia de *Acanthamoeba* spp. en piscinas de uso recreacional, al aire libre, de la ciudad de Córdoba, Argentina. Se recolectaron 30 muestras de agua correspondientes a un total de 10 piscinas. Estas se sembraron en agar no nutritivo en presencia de *Escherichia coli* en solución de Page. Luego de 72 horas de incubación a 37 °C, la identificación genérica se realizó mediante criterios morfológicos. La prueba de transformación amebo-flagelar se realizó para diferenciar amebas de vida libre que desarrollan trofozoítos flagelados, como *Naegleria*. Se midieron parámetros fisicoquímicos en cada una de las piscinas. Se identificó *Acanthamoeba* spp. en el 20% del total de las muestras. Las piscinas en las que se aisló este parásito presentaron niveles no detectables de cloro residual, pH moderadamente alcalino y temperatura templada. Este estudio demuestra la presencia de *Acanthamoeba* spp. en piscinas recreativas de Córdoba, lo que puede representar un potencial riesgo para la salud pública.

**Palabras clave:** *Acanthamoeba*; Amebas de vida libre; Argentina; Cloro; Piscinas

## Presence of *Acanthamoeba* spp. in outdoor recreational swimming pools in Córdoba city, Argentina

## Abstract

The aim of the study was to determine the presence of *Acanthamoeba* spp. in outdoor recreational pools, in Córdoba city, Argentina. Thirty water samples corresponding to a total of 10 pools were collected. These samples were sown on a non-nutritive agar in the presence of *Escherichia coli* in Pages's solution. After 72 hours of incubation at 37 °C, the generic identification was done based on morphological criteria. The amoeba-flagellate transformation test was performed to differentiate from genera that develop flagellated trophozoites, such as *Naegleria*. Physicochemical parameters were measured in each of the pools. *Acanthamoeba* spp. was identified in 20% of the samples. The pools, where this parasite was isolated, presented undetectable levels of residual chlorine, moderately alkaline pH and warm temperature. This study demonstrates the presence of *Acanthamoeba* spp. in recreational pools in Córdoba, which may represent a potential risk to public health.

**Keywords:** *Acanthamoeba*; Free-living amoebae; Argentina; Chlorine; Swimming pools

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)

## Presença de *Acanthamoeba* spp. em piscinas recreativas ao ar livre da cidade de Córdoba, Argentina

### Resumo

O objetivo do estudo foi determinar a presença de *Acanthamoeba* spp. em piscinas para uso recreativo, ao ar livre, na cidade de Córdoba, Argentina. Foram coletadas 30 amostras de água correspondentes a um total de 10 piscinas. Elas foram semeadas em ágar não nutritivo na presença de *Escherichia coli* em solução de Page. Após 72 horas de incubação a 37 °C, a identificação genérica foi realizada utilizando critérios morfológicos. O teste de transformação amebo-flagelar foi realizado para diferenciar amebas de vida livre que desenvolvem trofozoítos flagelados, como *Naegleria*. Parâmetros físico-químicos foram medidos em cada uma das piscinas. *Acanthamoeba* spp. foi identificada em 20% do total das amostras. As piscinas onde este parasita foi isolado apresentaram níveis indetectáveis de cloro residual, pH moderadamente alcalino e temperatura temperada. Esse estudo demonstra a presença de *Acanthamoeba* spp. em piscinas recreativas de Córdoba, o que pode representar um risco potencial para a saúde pública.

**Palavras-chave:** *Acanthamoeba*; Amebas de vida livre; Argentina; Cloro; Piscinas

### Introducción

Las amebas de vida libre (AVL) comprenden un grupo de protozoos anfitriónicos de distribución cosmopolita. Estos parásitos facultativos fueron aislados de diferentes hábitats tales como tierra, polvo, aire, agua de mar, agua potable, aguas termales, piscinas, aguas residuales, soluciones oftálmicas, lentes de contacto, unidades de diálisis y de tratamiento dental (1) (2). Los géneros de AVL asociados mayormente a infecciones humanas son *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris* (3). Varias especies de *Acanthamoeba* pueden causar diferentes cuadros clínicos, dentro de los que se incluyen la queratitis amebiana (QA), la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) a nivel del sistema nervioso central en el hospedador inmunocomprometido, lesiones cutáneas e infecciones sinusales (3) (4).

Este protozoo juega un rol destacado en la transmisión y diseminación de microorganismos patógenos ya que sirve de vehículo para la colonización de nuevos hábitats u hospedadores (5). El ciclo de vida de este parásito consta de dos etapas, una etapa activa o de trofozoíto y una etapa latente o de quiste, las cuales poseen características morfológicas distintivas (2). Los trofozoítos tienen un tamaño comprendido entre 13 y 40 µm, generalmente muestran un núcleo y presentan un desplazamiento unidireccional por emisión de pseudópodos hialinos. Además, en su citoplasma poseen un sistema de vacuolas de expulsión de agua que les permite mantener su medio osmótico (6). Los quistes poseen un tamaño que varía según la especie que no supera generalmente los 25 µm de diámetro y se caracterizan por presentar una pared doble y arrugada compuesta por un endoquiste y un exoquiste (6). Estas características morfológicas permiten la clasificación biológica a nivel del género *Acanthamoeba* (7) (8) y, en este trabajo, se consideraron criterios suficientes para su identificación.

Debido a la resistencia que presentan estas amebas a los biocidas, a la cloración y a condiciones ambientales hostiles como las altas temperaturas, la osmolaridad y el pH (9), se considera que las piscinas constituyen una fuente artificial de transmisión de *Acanthamoeba* (10). En la Argentina hay poca información disponible acerca de la distribución de este parásito en ambientes acuáticos, por lo cual se realizó un estudio para identificar la presencia de *Acanthamoeba* spp. en piscinas al aire libre en la ciudad de Córdoba, Argentina y de esta forma proporcionar información de salud pública.

### Materiales y Métodos

#### Recolección de muestras

Se recolectó un total de 30 muestras de agua correspondientes a 10 piscinas al aire libre, ubicadas en diferentes barrios de la ciudad de Córdoba, Argentina (Fig. 1 a y b). El muestreo se realizó utilizando frascos de vidrio estériles de 500 mL de capacidad en 3 puntos de muestreo por cada piscina (el fondo, la interfaz del borde y la entrada del filtro) con el objetivo de evaluar la distribución del parásito dentro de las mismas. Para la toma de muestra se procedió a sumergir cada uno de los frascos bajo el agua en los distintos puntos de muestreo. Una vez sumergidos se abrieron y al completar el volumen se cerraron bajo el agua para impedir el contacto con el aire y de esta forma evitar cualquier tipo de contaminación. Una vez recolectadas las muestras de agua se enviaron al laboratorio para su posterior análisis. El llenado de las piscinas estudiadas se llevaba a cabo mediante agua de red y el mantenimiento de las mismas se realizaba periódicamente por sus dueños.



Figura 1. Ubicación de la ciudad de Córdoba (longitud:  $064^{\circ}10'51.78''$  y latitud:  $S31^{\circ}24'48.6''$ ), provincia de Córdoba, centro de Argentina (A). Mapa de localización de cada una de las piscinas muestreadas (📍) dentro de la ciudad de Córdoba (B).

Las muestras se recolectaron en el período comprendido entre los meses de diciembre de 2017 y marzo de 2018. El procesamiento y análisis se realizó en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Católica de Córdoba.

#### Aislamiento e identificación de *Acanthamoeba* spp.

Cada muestra de agua recolectada se dejó reposar en el laboratorio durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante se descartó, reteniendo aproximadamente un volumen de 60 mL. Este volumen se transfirió a tubos Falcon™ estériles de 15 mL y se centrifugó sucesivamente a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió con solución salina de Page y se sembró en un agar no nutritivo (ANN) con 100  $\mu$ L de suspensión de *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922). Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 días, por duplicado. A las 72 horas se realizó la primera observación para verificar la presencia de trofozoítos y quistes, mediante microscopía óptica. Transcurridos los 15 días se descartaron aquellos cultivos que no mostraron crecimiento de AVL. En aquellas placas en las que se evidenció crecimiento, se realizó la identificación genérica de acuerdo a lo establecido por Page (7) y Pussard y Pons (8).

#### Prueba de transformación amebo-flagelar

Los cultivos que mostraron crecimiento se evaluaron con la finalidad de descartar la presencia de amebas flageladas de vida libre, como las pertenecientes al género

*Naegleria*. Las amebas aisladas se replicaron y se añadió 1 mL de agua destilada estéril para proporcionar la condición necesaria para el proceso de exflagelación y movilidad. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas y se evaluó la movilidad por flagelos a cada hora. La observación se prolongó durante 10 días para considerar la prueba negativa.

#### Análisis de parámetros fisicoquímicos

En cada piscina se registraron datos de temperatura ambiente y temperatura del agua mediante el uso de un termómetro de mercurio. El pH y la concentración de cloro residual de las piscinas se determinaron mediante el empleo de un kit comercial (kit de prueba de 2 vías P1920). Se registró la superficie y profundidad promedio de cada natatorio.

## Resultados

El 20% (6/30) de las muestras de agua recolectadas de las piscinas al aire libre en Córdoba, Argentina, presentaron crecimiento de AVL en cultivo en ANN en presencia de *E. coli* en solución de Page. Estos aislados correspondían a dos de las 10 piscinas estudiadas, que en función de las características morfológicas observadas, por microscopía óptica, se identificaron y clasificaron dentro del género *Acanthamoeba*. Este protozoo se aisló en los distintos puntos de muestreo estudiados (fondo, interfaz del borde y entrada del filtro). Los trofozoítos

aislados presentaron un tamaño variable de 14 a 23,5  $\mu\text{m}$ , con emisión de pseudópodos hialinos responsables del movimiento ameboideo, vacuolas contráctiles prominentes de exclusión de agua y un solo núcleo (Fig. 2a), mientras que los quistes mostraron un tamaño variable entre 8 y 14  $\mu\text{m}$  y doble pared (Fig. 2b). No se observó exflagelación en ningún aislado, lo que sugiere la ausencia de trofozoítos flagelados y, por lo tanto, el desarrollo de parásitos del género *Naegleria*. *Acanthamoeba* spp. se aisló de piscinas con una superficie entre 35 y 36  $\text{m}^2$  y una profundidad promedio entre 1,4 y 1,5 m, sin niveles detectables de cloro residual, con un pH moderadamente alcalino (7,2-7,8) y de temperatura templada (24-25 °C). La temperatura ambiental registrada fue de 28 °C en ambos casos (Tabla I).

## Discusión y Conclusiones

*Acanthamoeba* spp. es un parásito ampliamente distribuido en el medio ambiente. Se encuentra frecuentemente en muestras de agua de diversas procedencias. En

este trabajo este parásito se aisló e identificó en dos de las 10 piscinas estudiadas, mediante cultivo en ANN con *E. coli* en medio de Page. Las amebas se encontraron en los diferentes sitios de muestreo de estas piscinas y presentaban una distribución homogénea del parásito en el agua. Esto puede explicarse por la resistencia del quiste de doble pared y el mantenimiento y limpieza inadecuados de estas piscinas que permiten la supervivencia y el desarrollo de las amebas frente a las diferentes condiciones de los puntos de muestreo. Estos hallazgos coinciden con los reportados previamente por Inít *et al.* (11) quienes detectaron la presencia de *Acanthamoeba* en los cuatro sitios de muestreo que estudiaron. En contraposición, otros autores observaron una distribución no homogénea de este parásito en el agua de los natatorios (12) (13).

Diversos autores han conseguido aislar estos protozoarios de piscinas en diferentes ciudades de América del Sur. Los resultados de este trabajo mostraron ser similares a los publicados por Caumo y Rott (14), en Porto Alegre, Brasil, y superiores a los observados por Muñoz *et al.* (12) en Santiago, Chile y Garaycochea *et al.* (15) en Lima, Perú, quienes informaron una tasa de contamina-

Tabla I. Identificación de *Acanthamoeba* spp. en piletas al aire libre de la ciudad de Córdoba, Argentina y parámetros fisicoquímicos obtenidos durante la toma de muestra en el período 2017/18.

Número de piscina	Superficie ( $\text{m}^2$ ) / profundidad promedio de la piscina (m)	Presencia/ausencia de <i>Acanthamoeba</i> spp.	TAF	Cloro residual (ppm)	pH	Temperatura del agua (°C)	Temperatura ambiental (°C)
1	24 / 1,5	ausencia	-	3	7,2	20	25
2	30 / 1,5	ausencia	-	3	7,2	25	27
3	17,5 / 1,5	ausencia	-	3	7,2	23	24
4	35 / 1,5	presencia	-	0	7,2	24	28
5	36 / 1,4	presencia	-	0	7,8	25	28
6	44 / 1,5	ausencia	-	3	7,2	26	29
7	32 / 1,6	ausencia	-	3	7,8	25	27
8	18 / 1,4	ausencia	-	0,5	7,2	23	28
9	66 / 1,7	ausencia	-	3	7,6	25	28
10	45 / 1,6	ausencia	-	3	7,2	24	28

TAF: Transformación amebo-flagelar.

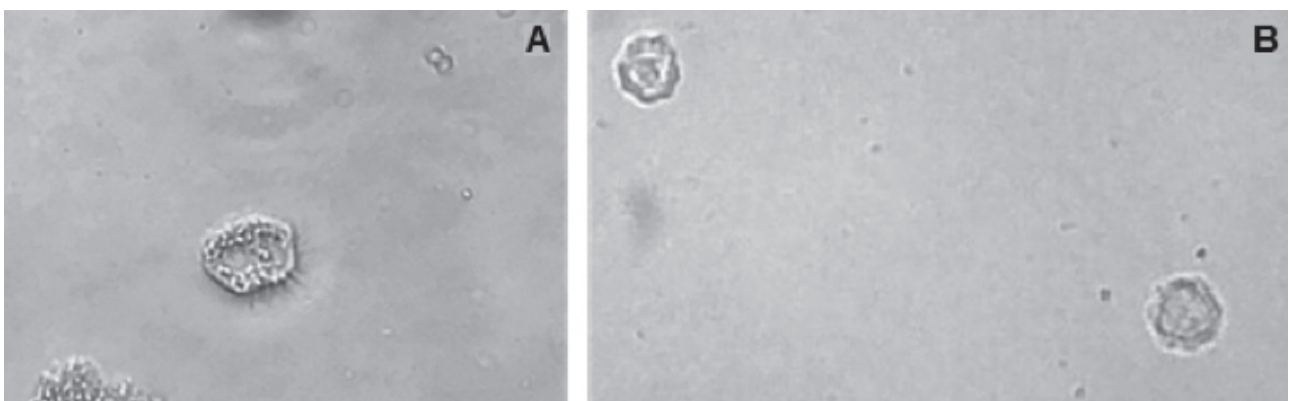


Figura 2. Fotografía de microscopía óptica de trofozoíto (A) y quistes (B) de *Acanthamoeba* spp. (400X), obtenida de cultivos de las muestras de agua de las piscinas estudiadas.



ción del 4,7-6,7%, respectivamente. En la Argentina, hay pocos estudios de distribución de *Acanthamoeba* en fuentes acuáticas artificiales. Gertiser *et al.* (13) informaron el aislamiento de esta ameba en el 29% de un total de 21 muestras de agua recolectadas de 7 piscinas, en temporada de verano, en la ciudad de Bahía Blanca. A pesar de que el estudio se realizó en natatorios cubiertos y en otra ciudad perteneciente a otra provincia argentina, el porcentaje de contaminación fue similar al descrito en este trabajo. Cabe señalar que la variación en la presencia de AVL en las piscinas puede deberse a las condiciones geográficas, los métodos de muestreo utilizados, los métodos de aislamiento e identificación y las condiciones de mantenimiento de las mismas.

En referencia a la relación de los parámetros fisicoquímicos con la presencia de AVL, diversos autores demostraron la resistencia de este protozoo a la cloración, ya que aislaron *Acanthamoeba* spp. de muestras de agua de piscinas con una concentración de cloro residual de hasta 3 ppm (13) (16). También se ha reportado el crecimiento del parásito en rangos de pH comprendidos entre 5,6 y 8,4, en ensayos *in vitro* (17). Sin embargo, en este estudio este protozoo se aisló de piscinas con niveles no detectables de cloro residual y pH dentro del rango permitido por la ordenanza 11566: Natatorios Públicos y Privados, (Municipalidad de la ciudad de Córdoba, Argentina, Boletín N° 2881 del 15 de diciembre de 2008), la cual establece que el agua de piscinas debe mantener una concentración de cloro residual entre 0,5-1,5 ppm y un rango de pH de 7,2-7,8. El resto de los natatorios estudiados, que se encontraron dentro de los parámetros exigidos, no mostraron desarrollo de AVL. La temperatura ambiente y del agua registradas fueron óptimas para el crecimiento y la reproducción de estos protozoos (2). A fin de establecer una asociación clara entre la variación de estos parámetros con el crecimiento de estas amebas se realizarán mayores estudios.

Se ha demostrado que las piscinas contaminadas por cepas patógenas de *Acanthamoeba* spp. son un posible factor de riesgo epidemiológico importante en el desarrollo de QA y EGA, especialmente en usuarios de lentes de contacto y hospedadores inmunocomprometidos, respectivamente (9) (18). Un estudio reciente ha reportado un número considerable de casos de QA en la ciudad de Córdoba (18). De estos casos, 17 de 21 (80,9%) de los pacientes eran usuarios de lentes de contacto que tenían un historial de mantenimiento inapropiado de los mismos, además, el 67% de los pacientes que participaron en el estudio manifestaron nadar con lentes de contacto *in situ* (18). Es por eso que los resultados de este trabajo enfatizan la importancia de considerar el agua de piscinas recreativas como una fuente artificial de *Acanthamoeba* spp. y un vehículo de transmisión de enfermedades causadas por estos microorganismos. Se recomienda una limpieza profunda de las piscinas para minimizar los riesgos de infección.

Este estudio demuestra por primera vez la presencia de *Acanthamoeba* spp. en piscinas recreativas al aire libre en la ciudad de Córdoba, Argentina.

## Fuentes de financiación

Este estudio fue financiado por la Universidad Católica de Córdoba.

## Conflictos de intereses

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

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. María Cecilia Carpinella por donar la cepa bacteriológica y al Dr. Sixto Raúl Costamagna por sus enseñanzas.

## Correspondencia

Bioq. Farm. JERÓNIMO LAIOLO  
Instituto de Recursos Naturales y Sustentabilidad José Sánchez Labrador S.J. (IRNASUS-CONICET),  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Avda. Armada Argentina 3555, X5016DHK, CÓRDOBA, Argentina.  
Correo electrónico: jeronimolaiolo@ucc.edu.ar

## Referencias bibliográficas

- Hassan A, Farouk H, Hassanein F, Abdul-Ghani R, Abdelhady AH. *Acanthamoeba* contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: A neglected potential source of infection. *J Infect Public Health* 2012; 5 (4): 304–10.
- Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 2012 Jan 10; 5 (1): 1–13.
- Visvesvara GS. Infections with free-living amoebae. 1st ed. Vol. 114, Handbook of Clinical Neurology. Elsevier 2013. p. 153–68.
- Morrison AO, Morris R, Shannon A, Lauer SR, Guarner J, Kraft CS. Disseminated acanthamoeba infection presenting with cutaneous lesions in an immunocompromised patient: a case report, review of histomorphologic findings, and potential diagnostic pitfalls. *Am J Clin Pathol* 2016; 145 (2): 266–70.
- Gomes TS, Vaccaro L, Magnet A, Izquierdo F, Ollero D, Martínez-Fernández C, *et al.* Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from drinking water treatment plants. *Sci Total Environ* 2020; 719:137080.
- Kot K, Łanocha-Arendarczyk NA, Kosik-Bogacka DI. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. *Ann Parasitol* 2018; 64 (4): 299–308.

7. Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool* 1967; 14 (4): 709–24.
8. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 1977; 13 (4): 557–98.
9. Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog* 2003; 34: 277–85.
10. Rezaeian M, Niyyati M, Farnia S, Motevalli Haghi A. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from different environmental sources. *Iran J Parasitol* 2008; 3 (1): 44–7.
11. Init I, Lau YL, Arin Fadzlan A, Foad AI, Neilson RS, Nissapatorn V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Trop Biomed* 2010; 27 (3): 566–77.
12. Muñoz V, Reyes H, Toche P, Cárcamo C, Gottlieb B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol Latinoam* 2003; 58: 106–11.
13. Gertiser ML, Visciarelli E, Basabe N, Perez MJ, Blanca B, Costamagna SR. *Acanthamoeba* spp. en piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2010; 44 (4): 697–703.
14. Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3 , T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop* 2011 Mar; 117 (3): 233-5.
15. Garaycochea M del C, Beltrán M, Morón C. Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2008; 25 (2): 204–7.
16. Paknejad N, Hajjalilo E, Saraei M, Javadi A. Isolation and identification of *Acanthamoeba* genotypes and *Naegleria* spp. from the water samples of public swimming pools in Qazvin, Iran. *J Water Health* 2020; 18 (2): 244–51.
17. Sakran T, Matoq P, El-shahawy G, Shalaby M, Sabry H, Gad M. Monitoring water quality parameters in Egyptian tap water. *Pol J Environ Stud* 2019; 28 (4): 2815–21.
18. Casero RD, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teherán A, *et al.* Morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol* 2017; 54: 170–5.

**Recibido: 5 de junio de 2020**

**Aceptado: 21 de septiembre de 2020**