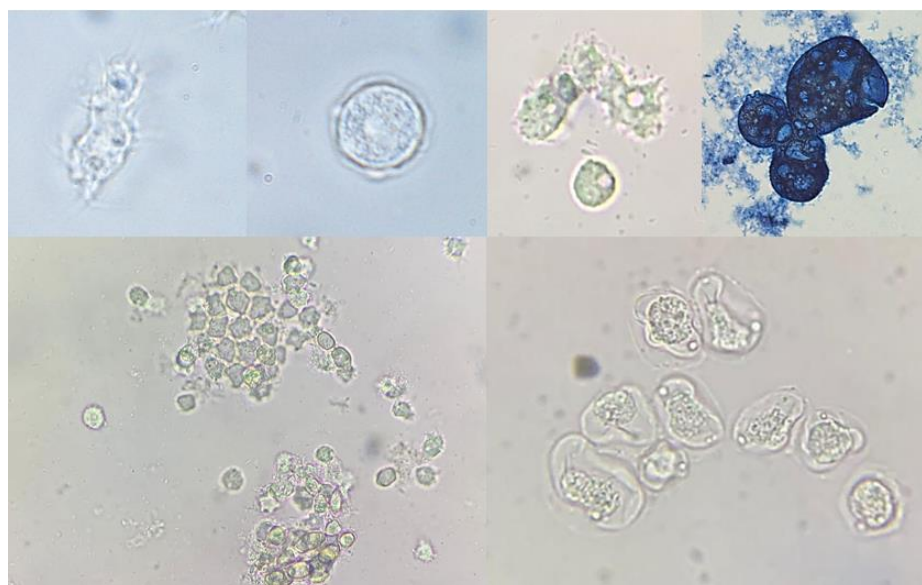


TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR-UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

ESTUDIO DEL IMPACTO DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE Y SUS BACTERIAS ENDOSIMBIONTES EN SALUD PÚBLICA



M^a Victoria Remacha Goñi

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública

Grupo de Agua y Salud Ambiental (IUCA)

Universidad de Zaragoza

Curso 2023-2024

Directores:

M^a Pilar Goñi Cepero

Antonio Beltrán Rosel

Este trabajo ha sido financiado y forma parte del proyecto PID2022-141402NB-I00: Caracterización y control de reservorios ambientales de microorganismos patógenos y genes de resistencia a antibióticos; Financiado por la Agencia Estatal de Investigación; Unión Europea.

Muchas gracias a mis directores Pilar y Antonio por enseñarme tantos conocimientos sobre microbiología y ayudarme a desarrollarlos a lo largo de todo el trabajo. También quiero agradecer a Pilar, M^a Peña y Rosa por esta oportunidad de formar parte de un proyecto tan completo y bonito. Por otro lado, agradecer a Pilar Mozas y al servicio de secuenciación por su buen trabajo y su ayuda para que las secuencias llegasen a tiempo. Por último, muchas gracias a mis padres, a Iván, a Susana y a Fran por apoyarme día a día.

RESUMEN

Las amebas de vida libre son protozoos que se encuentran de forma habitual en ambientes acuáticos (ríos, lagos, agua de red, piscinas, etc.), por lo que la población se ve expuesta constantemente a este tipo de microorganismos. Algunas especies de amebas de vida libre son patógenas, causando enfermedades en el hombre y los animales como la queratitis amebiana, que afecta al estroma corneal y es muy difícil de tratar ya que estos protozoos pueden adoptar formas de resistencia llamadas quistes y volver a crecer una vez acabado el tratamiento; de hecho, actualmente no existe un tratamiento universal efectivo para la queratitis amebiana. Por otro lado, las amebas de vida libre son capaces de albergar bacterias en su interior, protegiéndolas de los tratamientos de desinfección y favoreciendo la adquisición de mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Por este motivo, la caracterización de amebas de vida libre y sus bacterias endosimbiontes es de gran importancia para evitar posibles brotes que supongan un riesgo para la Salud Pública.

En este trabajo se ha realizado la identificación y estudio genotípico de diferentes cepas de amebas de vida libre mediante técnicas de microscopía y biología molecular, las cuales han mostrado una gran heterogeneidad en cuanto a crecimiento y factores de patogenidad. Además, se ha realizado un estudio exhaustivo de tratamientos antimicrobianos para la queratitis producida por *Acanthamoeba* y se han propuesto tratamientos alternativos que suponen una mejora tanto como amebicidas como para la calidad de vida del paciente. Finalmente, se ha procedido a la caracterización de bacterias endosimbiontes de las amebas estudiadas, así como la búsqueda e identificación de integrones y caracterización de genes de resistencia a antibióticos, habiéndose así encontrado bacterias patógenas resistentes a estreptomicina y betalactámicos entre otros.

ABSTRACT

Free-living amoebae are protozoa that are commonly found in aquatic environments (rivers, lakes, tap water, swimming pools, etc.), so the population is constantly exposed to this type of microorganisms. Some species of free-living amoebae are pathogenic, causing diseases in humans and animals such as amoebic keratitis, which affects the corneal stroma and is very difficult to treat since these protozoa can adopt forms of resistance called cysts and regrow a once the treatment is finished; in fact, there is currently no effective universal treatment for amoebic keratitis. On the other hand, free-living amoebas are capable of harbouring bacteria inside, protecting them from disinfection treatments and favouring the acquisition of resistance mechanisms against antibiotics. For this reason, the characterization of free-living amoebas and their endosymbiotic bacteria is of great importance to avoid possible outbreaks that pose a risk to Public Health.

In this work, the identification and genotypic study of different strains of free-living amoebae has been carried out using microscopy and molecular biology techniques, which have shown great heterogeneity in terms of growth and pathogenicity factors. Furthermore, an exhaustive study of antimicrobial treatments for keratitis caused by *Acanthamoeba* has been carried out and alternative treatments have been proposed that represent an improvement both as amebicides and for the patient's quality of life. Finally, the endosymbiont bacteria of the studied amoebas have been characterized, as well as the search and identification of integrons and characterization of antibiotic resistance genes, thus having found pathogenic bacteria resistant to streptomycin and beta-lactams, among others.

LISTADO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AVL: Amebas de Vida Libre

Clx: Clorhexidina

Voric.: Voriconazol

Cipro.: Ciprofloxacina

ANN: Agar No Nutritivo

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

MNN: Medio No Nutritivo

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

BLAST: Basic Local Alignment Tool

μ : constante específica de velocidad

g: tiempo de generación

K: velocidad de crecimiento

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

IC90: Concentración Inhibitoria 90%

IC50: Concentración Inhibitoria 50%

k: constante de velocidad de inactivación

D: tiempo de reducción decimal

EPT: Efecto Post-Tratamiento

CIF: Concentracion Inhibitoria Fraccional

ICIF: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional

Min.: minutos

ÍNDICE

1. Introducción.....1

2. Objetivos.....12

3. Materiales y métodos.....13

4. Resultados.....22

5. Discusión.....36

6. Conclusiones.....45

7. Conclusions.....46

8. Bibliografía.....47

9. Anexos.....55

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amebas de Vida Libre: definición y características

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos que se encuentran de forma natural en el medio ambiente. Viven en ambientes acuáticos, lo cual incluye aguas naturales, agua de red o incluso piscinas. Estos microorganismos han sido descritos como parásitos facultativos, patógenos y oportunistas¹ Por ello, su caracterización es de gran importancia, para poder optimizar un tratamiento efectivo en caso de patología

Las AVL son microorganismos unicelulares con un citoplasma rodeado por una membrana celular en cuyo interior se encuentran todos los orgánulos y el núcleo rodeado por una membrana nuclear. Esta membrana celular es de gran importancia puesto que constituye el límite físico y químico entre el protozoo y el medio exterior. En la morfología de las AVL destaca su vacuola contráctil, fácilmente observable al microscopio, que expulsa el exceso de agua del citoplasma, manteniendo así el equilibrio osmótico².

Como se puede observar en la figura 1, estos microorganismos pueden adoptar dos estadios morfológicos: trofozoíto y quiste. El trofozoíto es la forma metabólicamente activa, se alimenta de bacterias y se reproduce por fisión binaria. En cambio, el quiste es la forma de resistencia y su pared se compone de dos capas: la capa externa o ectoquiste y la capa interna o endoquiste. La capacidad de adoptar esta estructura quística confiere a las AVL gran resistencia frente a ambientes hostiles como condiciones ambientales adversas de temperatura, pH y presión osmótica, cloración y desinfección de aguas o la acción de biocidas y antimicrobianos³. Algunas especies de ellas como *Naegleria fowleri* tienen un tercer estadio morfológico en forma de flagelado que se desarrolla cuando no disponen de suficientes nutrientes³.

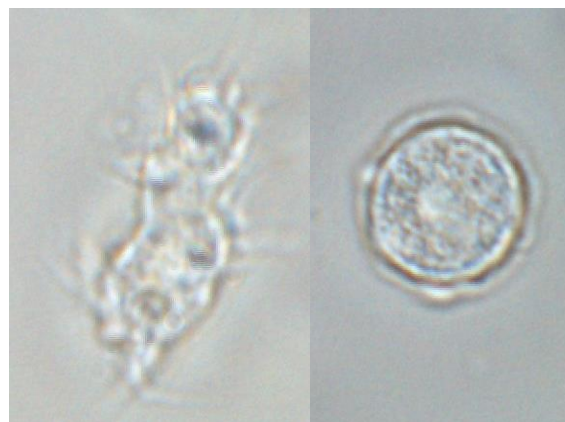


Figura 1: morfologías de las AVL: trofozoíto (izda.) y quiste (dcha.).

1.2 Papel que desempeñan las AVL en el medio ambiente

Las AVL se alimentan de bacterias (son bacteriófagas), por lo que contribuyen a la reducción de poblaciones bacterianas hasta en un 60%⁴; estos seres vivos presentan un papel ecológico muy importante, al controlar las poblaciones bacterianas. Así, colaboran en la autodepuración de las aguas naturales y también en la depuración de los vertidos urbanos en las depuradoras de aguas residuales urbanas. Por otro lado, algunos géneros como *Acanthamoeba* o *Hartmannella* (*Vermamoeba*) son capaces de albergar distintos tipos de microorganismos en su interior, incluyendo grupos taxonómicamente tan diversos como bacterias, virus o levaduras. Algunas de estas especies endosimbiontes, que habitan en el interior de las AVL, presentan un riesgo considerable para la salud pública, como *Legionella* spp., *Vibrio cholerae* o *Listeria monocytogenes*⁵.

Las formas quísticas de las AVL pueden ofrecer a dichos microorganismos una protección frente a la acción de desinfectantes y antimicrobianos, actuando como auténticos reservorios; además se ha comprobado que, de esta manera, los microorganismos endosimbiontes pueden evadir la respuesta inmune del hospedador⁶. La concentración de microorganismos en este hábitat puede favorecer el estrecho contacto entre los mismos facilitando el intercambio genético entre ellos, lo cual puede suponer la adquisición de ventajas adaptativas o un aumento de la patogenicidad^{7,8}.

De esta forma las relaciones de las amebas con los microorganismos con los que comparten su hábitat se pueden definir de tres formas:

- Depredación, cuando se alimentan de ellos.
- Protección, dando lugar a lo que se denomina “Caballo de Troya”, ya que les permite su transporte a puntos lejanos como los sistemas artificiales de agua, resistiendo a las desinfecciones y procesos de potabilización.
- Algunas bacterias intracelulares como *Legionella* no solo sobreviven a la depredación, sino que pueden multiplicarse dentro de las AVL.

Las bacterias albergadas en el interior de las AVL se denominan “Bacterias resistentes a las amebas”, pero además de bacterias, se han identificado virus, hongos o incluso protozoos endosimbiontes de las amebas^{9,10}.

Por todas estas razones, el estudio y caracterización de AVL y sus microorganismos endosimbiontes es de gran importancia para la Salud Pública, puesto que, además de ser patógenas por sí mismas, las AVL pueden albergar bacterias patógenas que pueden ser liberadas al medio causando patología en humanos, incluida la posibilidad de brotes en la población (por ejemplo, *Legionella*).

1.3 Géneros patógenos de AVL y *Acanthamoeba* spp.

Las AVL son conocidas como patógenos oportunistas. Existen varios géneros que han sido relacionados con patología en humanos, implicados fundamentalmente con cuadros de encefalitis: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Vermamoeba*, *Sappinia* y *Paravahlkampfia*¹¹.

Todos estos géneros son capaces de producir encefalitis, siendo ésta más grave en el caso de infección por *Naegleria fowleri*. Los géneros *Acanthamoeba* spp, *Vermamoeba* y *Paravahlkampfia* se han encontrado como causantes de queratitis amebiana en el hombre y los animales³. El medio de transmisión más frecuente de estos protozoos patógenos es el contacto con aguas contaminadas (tanto vía ocular como cutánea o inhalación), aunque también se pueden encontrar en el aire o en el polvo.

Acanthamoeba spp. es el género más frecuentemente aislado en suelo, agua y ambientes húmedos, y está permanentemente en contacto con el ser humano y los animales. Su forma de trofozoíto, que es la forma infectante, posee unos pseudópodos filamentosos llamados acanthopodios que hacen posible su movilidad¹³ y su forma de quiste tiene una pared interna y una externa que se unen en puntos denominados ostiolas, lo que les da una típica forma estrellada.

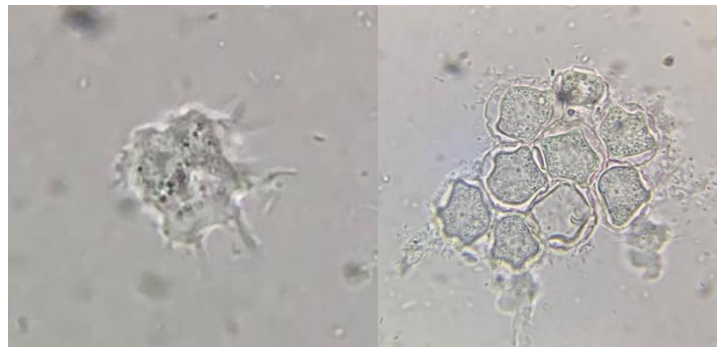


Figura 2: morfología de *Acanthamoeba*: trofozoíto (izda.) y quiste (dcha.).

De acuerdo a criterios morfológicos, se diferencian 24 especies de *Acanthamoeba* spp. que se agrupan en tres grupos principales (I, II, III)^{1,14}. Debido a la dificultad en la identificación mediante criterios morfológicos, se han utilizado técnicas moleculares para establecer la clasificación taxonómica de *Acanthamoeba*, basados en las diferencias que se encuentran en la secuencia de la región variable del 18SrRNA, según la cual hasta ahora existen 23 secuencias tipo o genotipos denominados de T1 a T23¹⁵. El genotipo T4 es el que se ha detectado con mayor frecuencia en aislamientos procedentes de humanos y es, por tanto, el considerado de mayor virulencia, aunque en literatura también se encuentran patologías asociadas a los genotipos T1, T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12 y T15¹⁶.

Como se puede observar en la figura 3, las vías de transmisión más frecuentes de *Acanthamoeba* spp. suele ser la exposición directa a tierra, aguas contaminadas con trofozoítos o quistes, siendo personas de riesgo los portadores de lentes de contacto. Cabe destacar que los quistes, al tener una doble membrana compuesta principalmente de celulosa, es altamente resistente al cloro y la desecación, por lo que se puede diseminar por medio de agua y polvo. Estos protozoos pueden ingresar al organismo por vía cutánea o respiratoria si se trata de individuos inmunodeprimidos. Por otro lado, se ha demostrado que *Acanthamoeba* spp. puede vehiculizar bacterias patógenas al tracto respiratorio¹⁷.

Existen tres síndromes clínicos relacionados con la infección *Acanthamoeba* spp., la queratitis amebiana, encefalitis amebiana granulomatosa primaria y acanthamebiosis cutánea¹⁶.

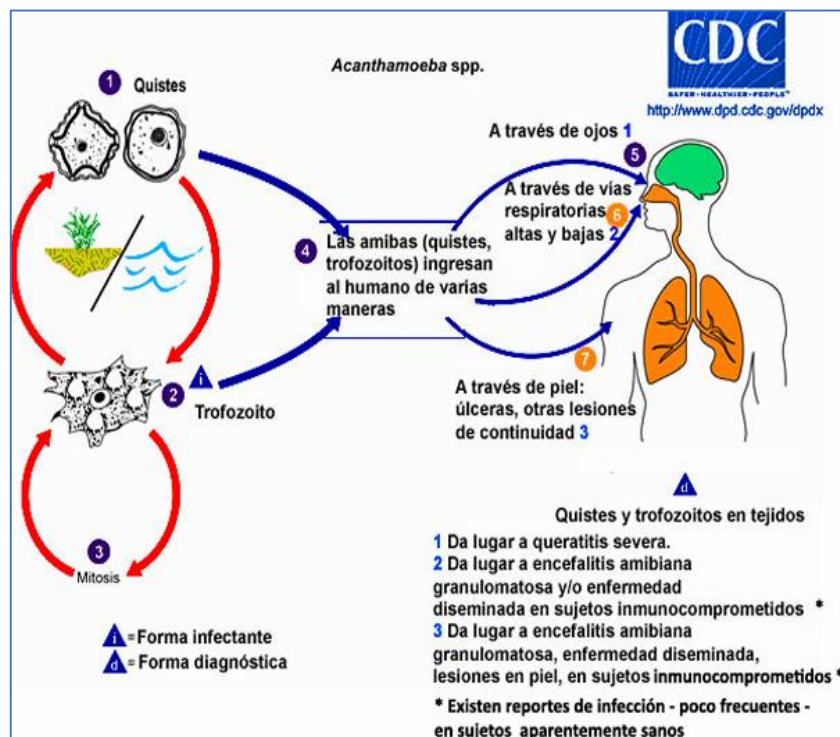


Figura 3: Ciclo biológico de *Acanthamoeba* spp. tomado de (18).

Al igual que otros microorganismos, *Acanthamoeba* puede vivir tanto en forma planctónica (formas de vida libre), así como en el interior de matrices poliméricas extracelulares, denominadas biofilms¹⁹.

Los biofilms tienen una extraordinaria importancia ecológica, ya que estas formas presentan una peor respuesta a los tratamientos químicos y térmicos que se utilizan para el control de microorganismos.

El control de biofilms formados en piscinas y tuberías, o la higiene correcta de lentes de contacto para evitar la formación de éstos supone un punto importante en Salud Pública, puesto que confieren un nicho de alimento y protección para *Acanthamoeba* spp., que le permite desenquistarse y pasar a fase trofozoito, que es la forma infectante.

1.4 Factores de patogenicidad de las AVL

El estudio de los factores que intervienen en la virulencia de las AVL es de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La patogenia de *Acanthamoeba* involucra una variedad de factores que pueden ser dependientes o independientes del contacto con el individuo; estos factores se muestran en la figura 4.

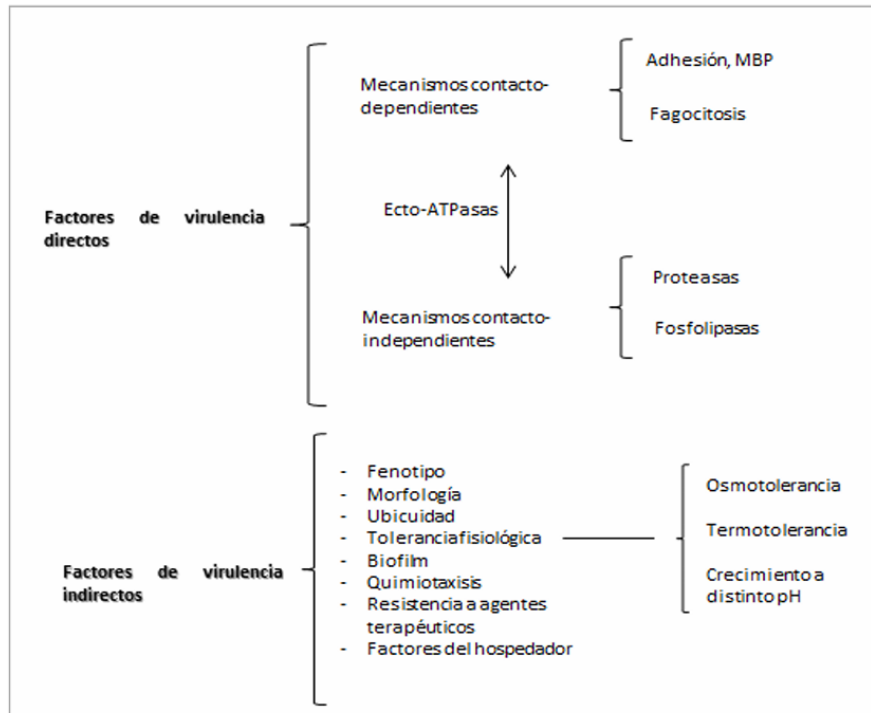


Figura 4: Factores de virulencia directos e indirectos, involucrados en la patogénesis a *Acanthamoeba*. Obtenido de (20).

Entre los factores de patogenicidad directos y dependientes del contacto se encuentran dos procesos que permiten la infección: adhesión y fagocitosis. La adhesión del parásito al tejido, que viene mediada por la proteína de unión a la manosa (MBP), que se expresa en la superficie de *Acanthamoeba*. Este proceso viene seguido de la fagocitosis, que consiste en la producción de toxinas que causan la muerte celular mediada por fosfatidilkinasa dependiente (PI3K), molécula que desencadena la activación de mediadores proapoptóticos y posterior necrosis celular en infecciones avanzadas²¹.

Dentro de los factores de virulencia directos e independientes del contacto, es de gran importancia la acción de las proteasas, que son enzimas que degradan el enlace peptídico total o parcialmente. En el caso de *Acanthamoeba*, el propósito de las enzimas es nutricional, aunque, al tener actividad colagenolítica, se ha observado que también facilitan la penetración del protozoo en el estroma corneal y el torrente circulatorio del cerebro causando la infección²². La virulencia de las cepas es mayor cuanto mayor es la actividad de estas proteasas.

Los factores de patogenicidad estudiados en este trabajo entran dentro de los factores indirectos, estos son la osmotolerancia (capacidad de resistir agentes tóxicos) y termotolerancia (capacidad de resistir altas temperaturas). La literatura indica que la tolerancia a altas temperaturas y osmolaridad, o la capacidad de crecer en medio axénico son indicadores de mayor virulencia de *Acanthamoeba*²³.

1.5 La queratitis amebiana

La queratitis amebiana es una infección ocular causada por AVL, siendo *Acanthamoeba* spp. el género más frecuentemente implicado. Estas infecciones son potencialmente graves y complicadas de curar puesto que los tratamientos disponibles no siempre resultan eficaces, ya que cada cepa tiene una velocidad de crecimiento y una sensibilidad diferente a los tratamientos²⁴. Esta enfermedad está asociada al uso de lentes de contacto, trauma ocular y exposición a aguas contaminadas²⁵; y se caracteriza por la inflamación y ulceración crónica de la córnea, pudiendo llegar a causar la pérdida total de la visión y del ojo si el tratamiento se retrasa.

Los síntomas de esta infección son dolor ocular, sensación de cuerpo extraño y en casos avanzados disminución e incluso pérdida de la agudeza visual. El daño en la córnea se manifiesta en forma de anillo en el estroma corneal, resultante de la proliferación de células de respuesta inmunitaria²⁶. En la figura 5 se puede observar cómo se manifiesta la queratitis amebiana.

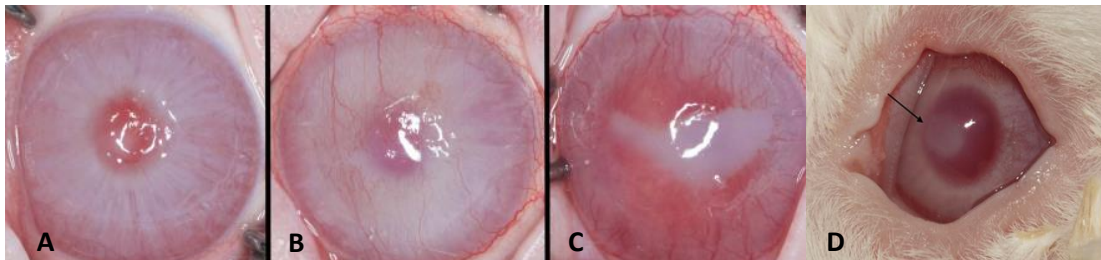


Figura 5: A, B y C - manifestación de queratitis amebiana. Tomada de (27). D- Queratitis provocada por *Acanthamoeba* en ojo de conejo. Cedida por Goñi P.

Los estudios realizados acerca de la queratitis amebiana muestran que los protozoos atacan únicamente el epitelio corneal previamente dañado, nunca intacto. De hecho, más del 80% de los casos de queratitis amebiana se dan en usuarios de lentes de contacto, estando el aumento de casos de queratitis amebiana asociado al aumento en el uso de lentes de contacto²⁸. Por ello, es muy importante el uso responsable de éstas y medidas de precaución como no bañarse con ellas o limpiarlas solo con el líquido especial para ello.

Para el diagnóstico de la queratitis amebiana, se requiere una muestra de raspado o biopsia corneal que siempre realiza un oftalmólogo. La muestra es depositada sobre la superficie de una placa de agar no nutritivo (ANN), en la que previamente se ha distribuido una suspensión de *Escherichia coli* inactivada por calor, como alimento. Es necesario tener en cuenta que las AVL pueden llegar a tardar hasta un mes en crecer. También se puede realizar una tinción y visualización al microscopio, pero esta técnica está en desuso puesto que es muy difícil diferenciar los quistes. Por otro lado, se puede realizar una PCR específica del género *Acanthamoeba*, pero su sensibilidad verse afectada por diversos factores como la cantidad de DNA presente en la muestra, de factores inhibidores de la PCR o la implicación de un género diferente a *Acanthamoeba*.

1.6 Antimicrobianos frente a la queratitis amebiana

No existe ningún tratamiento universalmente efectivo frente a la queratitis amebiana. Esto se debe, en parte, a la heterogeneidad observada en la virulencia y la sensibilidad frente a los diferentes fármacos antiparasitarios²⁹.

Todavía no se ha descrito ningún tratamiento como único y efectivo contra la queratitis amebiana debido a la gran variación en la patogenicidad y resistencia de las diferentes cepas³⁰.

Hay que tener en cuenta que se requiere la completa erradicación de todos los trofozoítos y quistes para evitar el riesgo de recurrencias, teniendo en consideración que la persistencia de un único quiste puede favorecer la reactivación de la infección y esta es la principal problemática de la infección por *Acanthamoeba* spp. dado que la permanencia de un único quiste puede dar lugar a un resurgimiento de la infección ³¹ (figura 6).



Figura 6: diagrama de queratitis amebiana, modificado de (24).

Los antimicrobianos utilizados suelen resultar irritantes para el tejido ocular, por lo que se suele aplicar mediante colirio cada hora las primeras 48 horas y después se va espaciando hacia las 8 horas durante 6 meses. En los casos más graves es necesario el trasplante de córnea. En ocasiones estos tratamientos no son suficientes y se procede al trasplante de córnea²⁵.

El principal objetivo de los tratamientos de primera línea es la lisis de trofozoítos y quistes, teniendo cada uno de ellos diferentes mecanismos de acción. La familia de antimicrobianos más conocida y más utilizada por su actividad amebicida es la de las biguanidas, entre las que se encuentran la polihexametil biguanida y la clorhexidina. Este tipo de compuestos presentan cargas positivas a pH fisiológico, lo que favorece su unión a la membrana plasmática, que está cargada negativamente, esto conlleva un incremento en la fluidez y permeabilidad de la membrana, provocando la lisis celular y con ello la muerte del microorganismo. En este trabajo se estudia el tratamiento de clorhexidina (clx.) (figura 7), cuya formulación se suele administrar al 0,02% como tratamiento de primera línea, aunque la problemática de este antimicrobiano es que puede resultar tóxica para las células de la córnea al exponerse a éste de forma prolongada, además de ser irritante para los tejidos³².

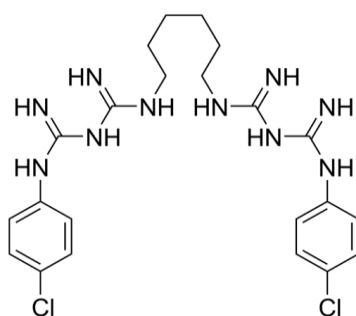


Figura 7: estructura de la clorhexidina.

El voriconazol (voric.) (figura 8) constituye un tratamiento alternativo de primera línea si el tratamiento con clorhexidina no resulta eficaz o presenta problemas. El voriconazol es un antimicrobiano de la familia de los imidazoles y que además presenta actividad antifúngica. Este tipo de compuestos alteran el metabolismo del ergosterol, disminuyéndolo y provocando un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y evitando la formación de quistes. Una importante limitación consiste en la menor actividad frente a las formas quísticas del parásito³².

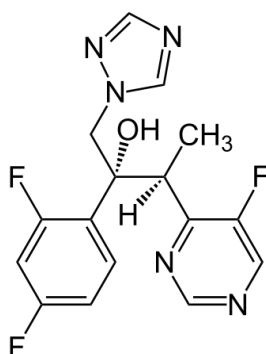


Figura 8: estructura del voriconazol.

Por otro lado, en este trabajo se estudia la efectividad de la ciprofloxacina (cipro.) (figura 9), un antimicrobiano que no está previamente descrito como amebicida. Este antibiótico pertenece a la familia de las fluoroquinolonas y está indicado como tratamiento de primera línea frente a infecciones bacterianas (tanto grampositivas como gramnegativas) y su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la replicación mediante su unión covalente a la DNA girasa, también se ha descrito que presentan actividad inhibidora de bombas de eflujo, lo que la convierte en una buena candidata para tratar la queratitis amebiana³³.

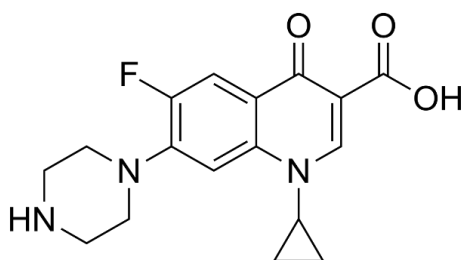


Figura 9: estructura de la ciprofloxacina.

En un trabajo previo²⁷, se investigó la actividad *in vitro* de diferentes compuestos, resultando una combinación entre los compuestos estudiados (clorhexidina, ciprofloxacina y voriconazol) el tratamiento más efectivo frente a *Acanthamoeba*. Este tratamiento tiene como ventaja que se utilizan tratamientos ya descritos que existen en formulación para colirio, a excepción de la clorhexidina que es de formulación farmacéutica. No obstante, las concentraciones aceptadas en este trabajo son las presentes en los colirios, por lo que queda pendiente el estudio de una posible reducción de las concentraciones. Además, en el estudio se incluyen solamente dos cepas, por lo que es necesario un estudio que incluya más cepas.

La potencial actividad sinérgica de varios compuestos antiparasitarios podría permitir la aplicación de clorhexidina a menores concentraciones, reduciendo así el riesgo de toxicidad²⁷ y haciendo posible un tratamiento más prolongado en el tiempo y más eficaz debido a la combinación de los distintos mecanismos de acción, o por el contrario, el aumento de eficiencia puede además, reducir el tiempo de tratamiento.

Finalmente, cabe mencionar que se han descrito otras alternativas en el tratamiento de la queratitis amebiana como son las infusiones de plantas³⁴ o terapias más novedosas como el cross-linking por medio de radiación ultravioleta³⁵ o el uso de siRNAs³⁶.

1.7 Resistencia a antibióticos

El problema de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos ha adquirido en los últimos años una gran relevancia. Es posible que las AVL jueguen un importante papel como reservorios ambientales de bacterias resistentes a los antibióticos, ya que como se ha mencionado anteriormente, son capaces de albergar y transportar bacterias en su interior. Estas bacterias, por lo tanto, pueden adquirir resistencias a los antibióticos. La gran dificultad que entraña el estudio de la resistencia a los antibióticos en nuevos hábitats hace recomendable restringir los mecanismos a estudiar y en este sentido, el estudio de los integrones resulta de mucho interés, al tratarse de elementos genéticos móviles y por lo tanto transferibles.

Molecularmente, la resistencia a antimicrobianos se rige por genes que pueden estar integrados en el genoma bacteriano o en elementos genéticos móviles, plásmidos o transposones. Los integrones, que son plataformas genéticas en las que se incorporan genes exógenos por un mecanismo de recombinación específico de sitio. Estos genes tienen una estructura particular, se denominan genes cassette y se expresan solo cuando la bacteria lo necesita, reduciendo así el coste energético que supone la expresión génica. Los integrones se componen de tres elementos: uno que codifica una integrasa, el lugar de recombinación sitio-específico y, por último, un promotor para la expresión de los genes casetes integrados (figura 10). Los integrones, al igual que los transposones (de los que suelen formar parte los integrones) son elementos genéticos móviles. Por otro lado, es importante mencionar que las secuencias de inserción. son pequeñas secuencias que favorecen la inserción de los genes de resistencia en los integrones y transposones.

Existen 9 clases de integrones según la secuencia de su integrasa, de los que las clases 1, 2 y 3 contienen genes cassette de resistencia a antibióticos. Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente encontrados en cepas aisladas de casos clínicos y se caracterizan por tener la secuencia 5' conservada (5'-CS) y la secuencia 3' (3'-CS) conservada que contiene genes de resistencia a componentes de amonio cuaternario y sulfonamidas. Por otro lado, los integrones de clase 2 tienen una estructura similar a los de clase 1 y contienen genes de resistencia a trimetoprim y estreptomicina. En cambio, los integrones de clase 3 contiene un gen casete que codifica una metalobetalactamasa, aunque falta mucha información acerca de esta clase de integrones³⁷.

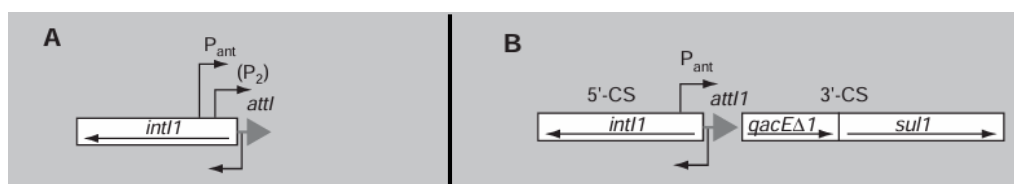


Figura 10: A- estructura común de todos los integrones caracterizada por el gen codificante de la integrasa (*intI1*), el lugar de recombinación específico (*attI*) y un promotor (*P_{ant}*) que permite la expresión de los genes casete insertados en el *attI* del integrón. B- Integrón de la clase 1 con la estructura común a todos los integrones en posición 5 (5-CS) y la secuencia conservada 3-CS.

1.8 Enfoque One Health

Por la relación entre los microorganismos que comparten hábitat en el medio ambiente, en el que se relacionan y establecen relaciones endosimbiontes, la potencial patogenicidad de las AVL y de las bacterias y otros microorganismos que albergan en su interior, la temática de este trabajo está incluida en la iniciativa “One Health”

Tal y como explica la Organización Global de la Salud, el enfoque One Health o “Una sola salud” considera que la salud de los humanos, de los animales y de los ecosistemas están interrelacionados y el equilibrio o desequilibrio en alguno de ellos implica un riesgo para los demás. Asimismo, este enfoque utiliza los vínculos entre ellos para establecer nuevos métodos de vigilancia y control de enfermedades³⁸.

Al encontrarse estos microorganismos en aguas naturales, expuestas a contaminantes emergentes y aguas residuales, pueden captar bacterias multirresistentes y albergarlas en su interior. La mencionada resistencia a condiciones ambientales desfavorables permite por tanto a estos microorganismos actuar como nicho del resistoma ambiental. Las AVL ofrecen protección a bacterias patógenas como *Legionella* spp., lo cual puede provocar un efecto “Caballo de Troya”, facilitando la infección y brotes que puedan suponer un riesgo para la Salud Pública³⁹. Además, se ha demostrado que la adaptación de bacterias patógenas al nicho intracelular amebiano puede favorecer la selección de variantes con una capacidad incrementada de supervivencia y multiplicación intracelular, lo que se relaciona con una especial virulencia de dichas variantes cuando éstas producen patología en humanos⁴⁰.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio del impacto de las AVL en la salud tanto de humanos como de animales y su análisis como reservorio de bacterias potencialmente patógenas y portadoras de genes de resistencia a antibióticos. Para conseguir este propósito se marcan cuatro objetivos específicos:

1. Caracterización de AVL de diferentes procedencias. Creación de una colección de *Acanthamoeba* caracterizadas morfológicamente, genotípicamente y por sus factores de patogenicidad extrínsecos.
2. Estudio de la efectividad de nuevos tratamientos frente a las amebas seleccionadas.
3. Identificación y caracterización de las bacterias endosimbiontes portadas por las amebas seleccionadas.
4. Identificación de genes de resistencia a antibióticos en las bacterias portadas por las AVL, tomando como referencia la detección y caracterización de integrones de Clase 1, 2 y 3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de *Acanthamoeba* spp.

Se estudiaron 4 cepas de colección *Acanthamoeba* spp. de diferentes genotipos y orígenes. En la tabla 1 se muestran las cepas y su origen.

Tabla 1: Cepas de colección de Acanthamoeba spp. estudiadas.

Nombre cepa	Origen	Lugar
P31	Piscina al aire libre	Zaragoza, España
C1211	Río Noguera Ribagorzana	Lérida, España
BCN2	Muestra clínica	Barcelona, España
BCN3	Muestra clínica	Barcelona, España

Además, se obtuvieron dos cepas a partir de muestras de agua de red. Se filtraron 500 ml utilizando un filtro MILLIPORE de 0,7 micras de diámetro de poro. A continuación, el filtro se depositó en una placa de ANN con *E. coli* inactivada por calor. Las placas se incubaron a 30°C en atmósfera aerobia. A las 24 horas se retiró el filtro y se continuó la incubación durante al menos 1 mes, observando diariamente al microscopio con el objetivo x10 en busca de trofozoítos. Cuando se observó crecimiento, se resembraron para obtener la ameba purificada. Estas cepas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Cepas de AVL obtenidas y estudiadas.

Nombre cepa	Origen	Lugar
TAA1	Agua de red	Tarazona, España
LU4	Agua de red	Luesia, España

3.2 Cultivo de amebas

En primer lugar, se cultivaron las amebas en ANN en placa de Petri. Las amebas obtenidas en cultivos positivos para este medio fueron subcultivada en medio PPYG. A continuación, se detallan los componentes de los medios utilizados.

- Medio no nutritivo (MNN): Se mezclan 50 ml de solución PAGE, 950 ml agua destilada, 15 g de agar bacteriológico tipo europeo, llevándolo a ebullición y esterilizando a 1 atm y 121°C durante 15 minutos. Sobre el ANN se distribuyeron 100 µl de una suspensión de *E. coli* (ATCC 25922) inactivada por calor, como nutriente para las amebas.
- PPYG: Se mezclan 20 g proteasa peptona, 5 g extracto levadura, 5 g glucosa, 50 ml solución PAGE, 950 ml agua destilada agitando hasta la disolución de los componentes y se autoclava a 1 atm y 121°C, durante 10 minutos. El medio PPYG se suplementa con antibióticos para evitar contaminaciones, en este caso a cada alícuota de medio (4ml) se añaden 25 µl estreptomicina 50 mg/ml, 6 µL fungizona 25 mg/ml y 25 µl ampicilina 10 mg/ml.

Composición solución PAGE: 2,4g NaCl, 0,08g MgSO₄·7H₂O, 0,08g CaCl₂·2H₂O, 2,84g Na₂HPO₄, 2,72g KH₂PO₄/ 1 litro de agua destilada.

Los cultivos se incubaron a 30°C en atmósfera aerobia, revisando diariamente su crecimiento.

La detección de los cultivos positivos se realizó mediante la inspección visual de las placas de agar mediante microscopia óptica con objetivo x10. Los cultivos en medio líquido se visualizaron con los objetivos de x10, x40 y x100. El cultivo se consideró positivo cuando fueron visibles quistes y/o trofozoítos compatibles morfológicamente con *Acanthamoeba* spp. o una AVL.

3.3 Caracterización de cepas de *Acanthamoeba*

Morfología

Se realizó una primera aproximación a la identificación utilizando las Claves de Page¹. La visualización de trofozoítos con acanthopodios y quistes de doble pared con forma poligonal permitió establecer la sospecha de cultivo positivo. En caso de morfologías diferentes, se procedió directamente a la identificación por técnicas moleculares.

La confirmación en la identificación se realizó por técnicas moleculares

Identificación molecular y estudio filogenético

En primer lugar, se realizó la extracción de DNA de las amebas utilizando el kit comercial (Norgen Stool Isolation Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la caracterización molecular de las cepas que no estaban previamente descritas se realizaron dos PCR⁴¹, utilizando los primers y protocolos que figuran en la tabla 3.

Tabla 3: región diana, secuencia de los cebadores, tamaño del producto amplificado y referencia de las PCR utilizadas para la caracterización de AVL.

Organismo	Región diana	Secuencia de los cebadores (directo y reverso)	Tamaño amplión (pb)	Referencia
AVL	Región conservada 18S rDNA	LAF 5'-CGC GGT AAT TCC AGC TCC AAT AGC-3' P-FLAR 5'-CAG GTT AAG GTC TCG TTC GTT AAC-3'	800-1500	Tsvetkova et al., 2004 ⁴²
<i>Acanthamoeba</i>	Amplión ASA.S1	JDP1 5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3' JDP2 5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAGCA-3'	500	Schroeder et al., 2001 ⁴³

Las condiciones y programas utilizados se detallan a continuación:

- PCR región conservada 18S rDNA para AVL: se utilizaron dos cebadores P-FLA R y P-FLA F a una concentración 0,8 µM, analizando 1 µl de DNA en un volumen final de 25 µl con 1,5 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 6 mM Y dNTPs 200 µM.
- PCR *Acanthamoeba* amplión ASA.S1: se utilizaron dos cebadores JDP1 y JDP2 a una concentración 0,5 µM, analizando 2 µl de DNA en un volumen final de 50 µl con 1,5 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 4 mM y dNTPs 200 µM.

Los resultados se observaron mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1,5% y las bandas resultantes se extrajeron del gel de agarosa y purificaron con el kit comercial Norgen PCR Purificaton Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA purificado se secuenció en ambas direcciones en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Zaragoza.

Se realizó una comparación de los fragmentos secuenciados con las secuencias registradas en el GenBank mediante la herramienta Basic Local Alignment Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los fragmentos secuenciados se analizaron y alinearon utilizando el programa BioEdit® (<https://bioedit.software.informer.com/Descargar-gratis/>) y se obtuvieron los árboles filogenéticos por el método neighbor-joining con un Bootstrap de 1000 replicaciones utilizando el programa MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>) para la identificación de los genotipos.

Estudio de factores de patogenicidad

Para evaluar el comportamiento frente a diversos factores ambientales, se sometió a las amebas a diferentes temperaturas de incubación (30°C, 37°C y 45°C) así como a diversas concentraciones de manitol (0,3 M; 0,5 M y 1 M). Para ello se depositaron 20 µl de un cultivo de amebas en PPYG en el centro de placas ANN con *E. coli* y se incubaron a las diferentes temperaturas; por otro lado, la osmotolerancia se evaluó depositando un cultivo similar en placas de ANN con *E. coli* y manitol a diferentes concentraciones. Se monitorizó el crecimiento y viabilidad de las AVL durante un periodo de 15 días, buscando específicamente la presencia de trofozoítos en el medio de agar. En aquellos casos en los que no fueron detectados trofozoítos, se valoró la posible recuperación de las AVL, haciendo una resiembra de los quistes presentes en nuevas placas de ANN con *E. coli* incubando a 30°C durante al menos 15 días y revisando diariamente la aparición de trofozoítos. La aparición de dichos trofozoítos se consideró tolerancia a la temperatura o al manitol, sin crecimiento.

Curva de vida

En un vial se introdujo 1 ml de medio PPYG, suplementado con antibióticos, y una concentración de ameba de 10^4 células/ml obtenidas por centrifugación a partir de un cultivo axénico. A continuación, se realizó un recuento diario utilizando una cámara de Neubauer. La curva de vida se realizó a partir de la media de tres réplicas de recuento.

A partir de la curva se calculó la constante específica de velocidad (μ), el tiempo de generación (g) y la velocidad de crecimiento (K). Estos parámetros se explican más detalladamente en el apartado de resultados.

3.4 Estudio de efectividad de tratamientos

Para la realización de los estudios se utilizaron los siguientes fármacos:

- Clorhexidina (SIGMA-ALDRICH®, USA), en forma de Digluconato de Clorhexidina al 20%.
- Ciprofloxacina (SIGMA-ALDRICH®, USA).
- Voriconazol (SIGMA-ALDRICH®, USA).

Determinación de la sensibilidad

Para determinar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas se utilizó el método de dilución en caldo, en placa de microtitulación. En cada pocillo se introdujo medio PPYG sin suplemento de antibióticos, con un inóculo de ameba a una concentración final de 10^5 - 10^8 células/ml dependiendo de la disponibilidad de la cepa. Finalmente, se introdujo cada antimicrobiano en los siguientes rangos de concentración:

- Clorhexidina: de 0,08% a 0,0025% en diluciones seriadas a la mitad.
- Ciprofloxacina: de 6 mg/ml a 0,18 mg/ml en diluciones seriadas a la mitad.
- Voriconazol: de 2% a 0,12% mg/ml en diluciones seriadas a la mitad.

Después de 24h, se realizó el recuento por triplicado de las amebas que permanecían viables y se calculó la media. Para ello se realizó una tinción con azul tripán. La viabilidad de los posibles quistes restantes se determinó mediante cultivo en agar y revisión diaria durante al menos 15 días de crecimiento. El principal resultado obtenido fue la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la mínima concentración a la cual no se observan amebas viables. También se determinó la concentración a la que se produce la muerte del 90% de las células (IC90) y la concentración a la que se produce la muerte del 50% de las células (IC50). El experimento se realizó por triplicado y al menos una réplica se sembró en agar Müller-Hinton, incubando a 37°C durante 24 horas para observar posible crecimiento de bacterias endosimbiontes.

Curva de muerte

Se introdujo un inóculo de *Acanthamoeba* spp. de 10^5 - 10^8 células/ml en 1ml de medio PPYG sin suplemento de antibióticos y se añadió la CMI de antimicrobiano (obtenida del anterior ensayo). Se registró la dinámica de muerte celular en sus distintas fases mediante tinción con azul tripán y recuento en cámara de Neubauer.

Se realizaron recuentos cada 10-15 minutos durante la primera hora, a partir de la cual, la frecuencia pasó a ser de 60 minutos y finalmente realizando un recuento a las 24 horas. Se comprobó la viabilidad de los quistes presentes mediante siembra en ANN revisión diaria durante al menos 15 días.

A partir de las curvas de muerte obtenidas se calcularon los parámetros de constante de velocidad de la inactivación y tiempo de reducción decimal, los cuales se explican en el apartado de resultados.

Efecto post-tratamiento

Se inoculó *Acanthamoeba* spp. a una concentración de 10^5 - 10^8 células/ml en 1ml de medio PPYG sin suplemento de antibióticos con el antimicrobiano a la CMI y manteniendo el contacto durante el tiempo definido para cada ameba y fármaco (0,8 veces el tiempo de erradicación). Una vez pasado este tiempo, se realizó una centrifugación de la mezcla y lavado con suero fisiológico estéril (SFE). El pellet resultante posterior al lavado se introdujo en 1 ml de medio PPYG con suplemento de antibióticos y se observó la muerte y posterior crecimiento de la ameba mediante tinción con azul tripán y recuento en cámara de Neubauer. Se determinó la viabilidad de los quistes existentes mediante cultivo en ANN y observación de las placas diariamente durante al menos 15 días. Como dato importante, se calculó la duración del efecto post tratamiento (EPT).

Estudio de combinaciones entre antimicrobianos

Para analizar la efectividad de las sinergias se realizaron ensayos de determinación de la sensibilidad de combinaciones de fármacos por el método del tablero o “Checkboard” con todas las posibles combinaciones de los antimicrobianos estudiados⁴⁴:

- Clorhexidina (0,04%-0,0025%) + Voriconazol (2%-0,12%). Ambos en diluciones seriadas a la mitad.
- Clorhexidina (2%-0,12%) + Ciprofloxacina (6-0,37 mg/ml). Ambos en diluciones seriadas a la mitad.
- Ciprofloxacina (6-0,37 mg/ml) + Voriconazol (2%-0,12%). Ambos en diluciones seriadas a la mitad.
- Ciprofloxacina 0,75 mg/ml + Voriconazol 0,25% + Clorhexidina 0,01%-0,0006% en diluciones seriadas a la mitad.

Se realizó un recuento en cámara de Neubauer una vez transcurridas 24 horas de la administración, realizando una tinción con azul tripán para discernir las células vivas de las muertas.

Se calculó la concentración inhibitoria fraccional (CIF) de cada antimicrobiano y el índice de concentración inhibitoria fraccional (ICIF), que se explican en el apartado de resultados

3.5 Estudio de las bacterias endosimbiontes

Selección de las bacterias

Para obtener las bacterias endosimbiontes de las amebas, se tomaron 3ml de cultivo axénico y se centrifugaron a 6000 g durante 10 minutos, seguido de un lavado con SFE por triplicado. A continuación, se realizó un recuento de las amebas y se ajustó la concentración a 10^5 células/ml. Se depositaron 200 μ l de la disolución resultante en un tubo con microesferas de zirconio y se agitaron vigorosamente con vórtex y la suspensión resultante se depositó en una placa de agar Müller-Hinton y se distribuyó con un asa de Driglasky. Las placas obtenidas se incubaron a 37°C en atmósfera aerobia durante 24 horas. En caso de crecimiento positivo, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Se realizó un subcultivo de las bacterias crecidas con la finalidad de obtener un cultivo bacteriológico puro y poder realizar las pruebas de sensibilidad antibiótica (antibiogramas). En el antibiograma se incluyeron los siguientes antibióticos:

- Estreptomicina 10 μ g.
- Ampicilina 10 μ g.
- Ceftacidima 30 μ g.
- Imipenem 10 μ g.

Las pruebas de sensibilidad antibiótica se realizaron mediante la técnica de Kirby-Bauer o disco-placa. Las placas se incubaron durante 24h en atmosfera aerobia a 37°C. Los resultados obtenidos fueron diámetros del halo sin crecimiento bacteriano alrededor del disco con antibiótico.

Identificación de bacterias

La identificación de las bacterias endosimbiontes se realizó por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF MS por desorción-ionización con láser asistida por matriz (espectrómetro de masas SIRIUS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

Para este análisis, se utilizó una muestra previamente disuelta en una matriz orgánica, de forma que se obtuvo una fuente de iones suave para conseguir la ionización de la muestra, cuyas moléculas quedan embebidas en los cristales de la matriz. Esta matriz tiene la función de absorber la energía transmitida por el láser del aparato y transferirla a la muestra.

El primer paso fue la mezcla de la muestra con la matriz en una placa de depósito de muestras, y a continuación, éste se introdujo en el espectrómetro de masas. Durante el proceso de análisis se generaron los iones a partir de la muestra y el detector de tiempo de vuelo (TOF) permitió separar los diferentes iones según su relación masa/carga. De esta forma se generó un espectro de masas.

Una vez obtenido el espectro, se realizó una comparación del mismo frente a una librería de espectros conocidos de microorganismos. Esta identificación fue posible debido a que cada especie microbiana tiene un espectro de masas característico, aunque los grupos filogenéticamente próximos pueden llegar a compartir ciertos picos⁴⁵.

Las identificaciones bacterianas obtenidas mediante el espectrómetro comercial de Bruker (así como el de otras casas comerciales) tienen una importante limitación: el catálogo de especies bacterianas de sus librerías de espectros incluye especies de relevancia clínica en el ámbito de la salud humana. Esto quiere decir que las bacterias obtenidas a partir de muestras ambientales podrían ser identificadas de una forma menos precisa. Por ello es importante tener cierta cautela a la hora de asumir como ciertas algunas de las identificaciones bacterianas obtenidas mediante MALDI-TOF MS. De especial interés resulta el score de identificación obtenido para cada muestra: se trata de un valor numérico que permite categorizar el grado de certeza en la identificación. Se considera una identificación fiable cuando el score es $\geq 2,00$

Búsqueda de genes de resistencia

Para buscar genes de resistencia en las bacterias endosimbiontes se realizaron PCRs en colonia bacteriana obtenida por subcultivo. En primer lugar, se recogió una colonia y se introdujo en un tubo eppendorf de 200 μ l con agua bi-destilada estéril y la suspensión se hirvió durante 10 minutos; de esta forma se obtuvo el DNA de las bacterias.

Para detectar integrones en las bacterias se realizaron 3 PCRs específicas para integrones de clase uno, dos y tres. Estas PCRs detectan una secuencia de la enzima integrasa que se encuentra dentro de los integrones y permite que los genes de resistencia se adicionen a éstos. Se utilizaron dos cebadores Int1/2/3F e Int1/2/3R a una concentración 2 μ M, analizando 10 μ l de DNA en un volumen final de 25 μ l con 1,5 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 1,5 Mm y dNTPs 200 μ M. Los resultados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Los cebadores y protocolos se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: PCR, secuencia de los cebadores, tamaño del amplicón y referencia para las PCRs de detección de integrones.

PCR	Cebador	Secuencia de los cebadores (directo y reverso)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Int1	Int1 1-F	TCTCGGGTAACATCAAGG	254	Firoozeh <i>et al.</i> , 2019
	Int1 1-R	AGGAGATCCGAAGACCTC		
Int2	Int1 2-F	CACGGATATGCGACAAAAGG	788	Firoozeh <i>et al.</i> , 2019
	Int1 2-R	TGTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
Int3	Int1 3-F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600	Firoozeh <i>et al.</i> , 2019
	Int1 3-R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG		

Por otro lado, para caracterizar los integrones detectados se realizaron 3 PCRs, utilizando los primers y protocolos que figuran en la tabla 5.

Tabla 5: PCR, secuencia de los cebadores, tamaño del amplicón y referencia para las PCRs de caracterización de integrones.

Organismo	Cebador	Secuencia de los cebadores (directo y reverso)	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
5'CS	5'CS-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	900-2000	Firoozeh <i>et al.</i> , 2019 ⁴⁶
3'CS	3'CS-R	AAGCAGACTTGACCTGA		
attI2	attI2-F	GACGGCATGCACGATTTGTA	2000	Firoozeh <i>et al.</i> , 2019 ⁴⁶
OrfX	OrfX-R	GATGCCATCGCAAGTACGAG		
IntI2	IntI2-F	CACGGATATGCGACAAAAGG	-	Ploy <i>et al.</i> , 2000 ⁴⁷
Sul1	Sul-R	CGAACCTGCTAACTAGGTA		

Las condiciones y programas utilizados se detallan a continuación:

- Caracterización de integrones de clase 1: se utilizaron dos cebadores 5'CS-F y 3'CS-R a una concentración 1 μ M, analizando 10 μ l de DNA en un volumen final de 50 μ l con 1,5 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 1,5mM y dNTPs 200 μ M.
- Caracterización de integrones de clase 2: se utilizaron dos cebadores attI2-F y orfX-R a una concentración 1 μ M, analizando 10 μ l de DNA en un volumen final de 50 μ l con 1,5 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 1,5mM y dNTPs 200 μ M.
- Caracterización de integrones de clase 2: se utilizaron dos cebadores Int2F y SulR a una concentración 1 μ M, analizando 10 μ l de DNA en un volumen final de 50 μ l con 1,5 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 1,5mM y dNTPs 200 μ M.

Las bandas resultantes de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de un peso \geq 900pb, se cortaron y se purificaron utilizando un kit comercial (Norgen PCR Purification Kit). Finalmente, el DNA purificado se envió al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Zaragoza.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de cepas de *Acanthamoeba*

De las seis cepas estudiadas las cepas P31 y C1211 al ser de colección ya estaban caracterizadas previamente mediante biología molecular. Por otro lado, las cepas BCN2, BCN3, TAA1 y LU4 se caracterizaron morfológicamente y mediante técnicas de biología molecular.

Morfología

En los cultivos correspondiente a las cepas P31, C1211, BCN2, BCN3 y TAA1 se detectaron trofozoítos y/o quistes morfológicamente compatibles con amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* según las claves de Page¹.

En la figura 11 se pueden observar los trofozoítos con acanthopodios y los quistes con forma poligonal característicos de *Acanthamoeba*.

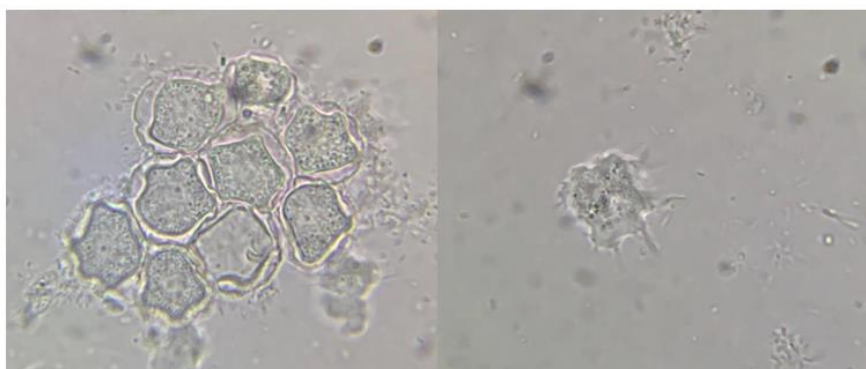


Figura 11: quistes (izda.) y trofozoítos (dcha.) de *Acanthamoeba* (cepa BCN2).

La figura 12 muestra la visualización microscópica de la cepa LU4. Se observa presencia de múltiples vacuolas con formación de pseudópodos de tipo lobopodio, un núcleo y rodeadas por una pared que podía indicar que se trata de pseudoquistes. Dicha descripción puede corresponder a amebas de la familia *Vahlkampfidae*⁴⁸, sin llegar a poder determinar el género concreto.

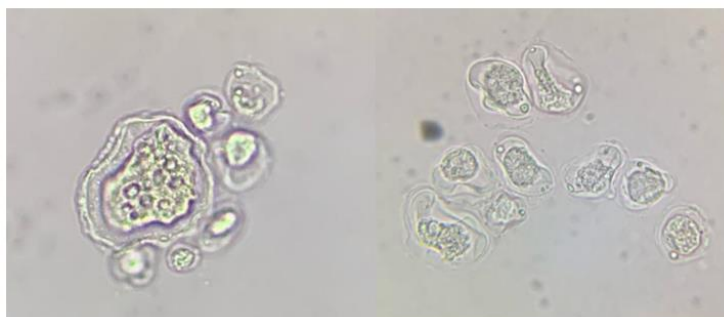


Figura 12: visualización microscópica de trofozoítos de la cepa LU4.

Identificación molecular.

Al comparar con las secuencias registradas en el GenBank las secuencias obtenidas para los amplicones de las PCR JDP y FLA, se confirma que las amebas P31, C1211, BCN2, BCN3 y TAA1 son *Acanthamoeba*. La secuencia obtenida para el fragmento del 18SRNA amplificado por la PCR FLA de la ameba LU4, mostró un 98,22% de homología con la secuencia registrada en el Gen Bank con número KX068999.1, que corresponde a *Paravahlkampfia ustiana*, por lo que se identifica como perteneciente a este género. Por otro lado, la secuencia obtenida para la TAA1 fue tan solo de 53 pb, muy corta para su posterior estudio, pero que presentó una homología del 100% con la secuencia de *Acanthamoeba* registrada en el Gen Bank con número OR770527.1.

Caracterización de genotipos: filogenética

Utilizando el programa BioEdit, las secuencias de las cepas obtenidas por amplificación con PCR JDP, se compararon entre sí y con una selección de secuencias tomadas del GenBank y que corresponden a los diferentes genotipos descritos para *Acanthamoeba*. El fragmento a comparar se ajustó al de la secuencia más corta, habiendo comparado, por tanto, 470 pb.

La figura 13 muestra el árbol filogenético obtenido, en el que se observa que las cepas objeto de estudio se agrupan con las de referencia correspondientes al genotipo T4.

Observando la matriz identidad obtenida a partir del estudio filogenético se evidencia que la homología entre las cepas BCN2 y BCN3 es de un 99,7%. Por otro lado, la cepa C1211 presenta una homología del 98,8% con la cepa BCN2 y de un 99,1% con la cepa BCN3. En cambio, la cepa P31 presenta con las anteriores una homología del 93,1% y 93,4% respectivamente; mientras que su homología con la cepa C1211 es del 99,1%.

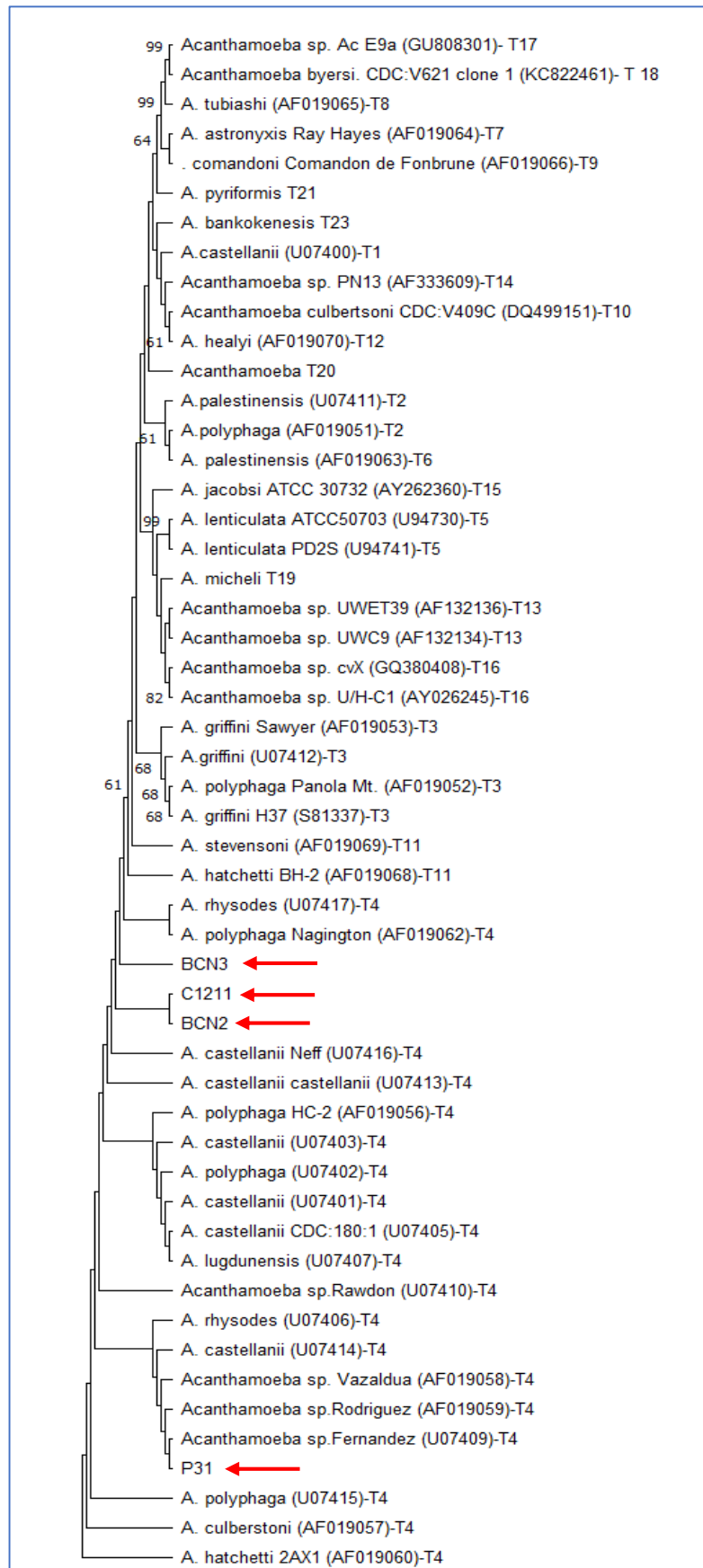


Figura 13: árbol filogenético obtenido tras el estudio genotípico.

Estudio de factores de patogenicidad

En los ensayos de termotolerancia se observó crecimiento de todas las cepas a 30°C y 37°C; mientras que a 45°C se observó crecimiento de todas las cepas, excepto de BCN3; que tras la resiembra de los quistes en una nueva placa y su incubación a 30°C, se apreció la aparición de trofozoítos, indicativa de su viabilidad.

En cuanto a los ensayos de osmotolerancia, se observó crecimiento de todas las cepas al ser expuestas a manitol 0,1M. Al exponer las cepas a manitol 0,3M, crecieron todas las cepas excepto de la BCN3, que nuevamente mostró su viabilidad al transferir sus quistes a una nueva placa e incubar a 30 °C. En cambio, a concentraciones de manitol de 1M, solo crecieron las cepas TAA1, P31 y C1211.

Curva de vida

Para estudiar el crecimiento de *Acanthamoeba* spp., se obtuvieron las curvas de vida para cada cepa. En la figura 14 se muestra la curva de la cepa P31, mientras que las curvas de las demás cepas se muestran en los anexos (figuras S1, S2, S3 y S4). En ellas se puede observar una fase de latencia inicial, seguida de una fase exponencial en la que se produce el crecimiento hasta que se estabiliza en la fase estacionaria. En ocasiones, al final de la curva se puede observar un pequeño decrecimiento que se corresponde con una fase de enquistamiento y muerte de algunos trofozoítos.

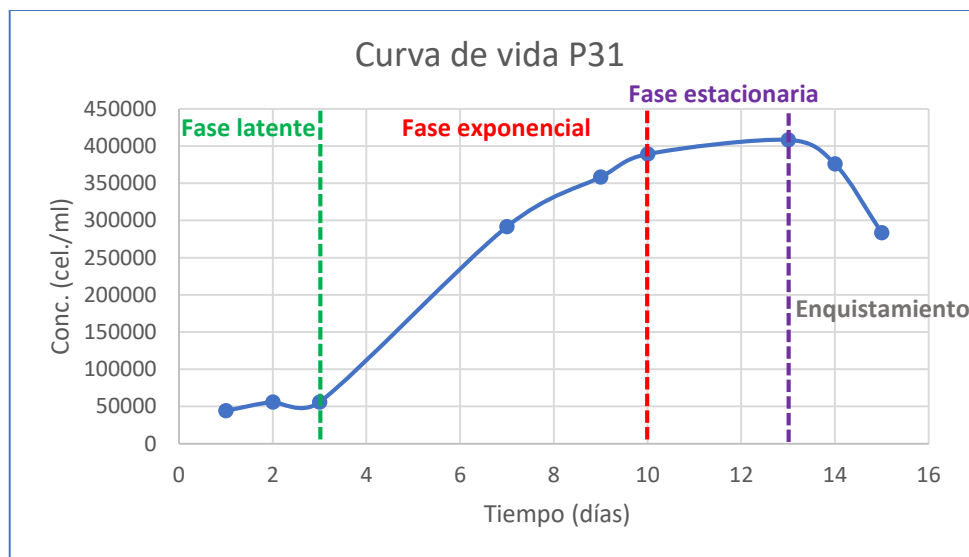


Figura 14: curva de vida de la cepa P31.

En primer lugar, es importante considerar los tiempos que les cuesta alcanzar las fases exponencial y estacionaria a las diferentes cepas, lo cual se muestra en la tabla 6.

Tabla 6: tiempo que tardan las diferentes cepas en alcanzar la fase exponencial y la fase estacionaria.

Cepa	Tiempo fase exponencial (días)	Tiempo fase estacionaria (días)
P31	3	10
C1211	9	16
BCN2	1	7
BCN3	1	7
TAA1	4	11

A partir de la curva de vida de cada cepa se obtuvo la siguiente información⁴⁹:

- Constante específica de velocidad de crecimiento (μ): debido a que las cinéticas de crecimiento son de orden 1, se ajustan a la siguiente ecuación: $\ln C - \ln C_0 = \mu (t - t_0)$
Por lo tanto, μ es la pendiente resultante de la representación de los logaritmos neperianos de las concentraciones frente al tiempo.
- Tiempo de generación (g): tiempo que tarda en duplicarse la población amebiana.

$$g = \ln 2 / \mu$$

- Velocidad de crecimiento (K): inversa del tiempo de generación

$$K = 1/g$$

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos a partir de las curvas de vida de las cepas estudiadas. Cabe mencionar que la cepa LU4 no fue capaz de crecer en medio axénico, por lo que no fue posible continuar los estudios con ella.

Tabla 7: parámetros de crecimiento amebiano obtenidos a partir de las curvas de vida.

Cepa	μ (día ⁻¹)	g (días)	K (generaciones/día)
P31	0,28	2,44	0,41
C1211	0,38	1,8	0,55
BCN2	0,33	2,11	0,47
BCN3	0,26	2,69	0,37
TAA1	0,34	2	0,50

4.2 Estudio de efectividad de tratamientos

Determinación de la sensibilidad

Tal y como muestran las tablas 1, 2 y 3, se determinaron la CMI, la IC50 e IC90 para los tratamientos con clorhexidina, ciprofloxacina y voriconazol respectivamente (Tablas 8, 9 y 10).

Tabla 8: resultados de CMI, IC50 e IC90 para el tratamiento con clorhexidina.

Cepa	CMI (%)	IC50 (%)	IC90 (%)
P31	0,02	0,0025	0,005
C1211	0,04	<0,0025	0,0025
BCN2	0,02	0,0025	0,01
BCN3	0,04	0,0025	0,005
TAA1	0,01	0,005	0,01

Tabla 9: resultados de CMI, IC50 e IC90 para el tratamiento con ciprofloxacina.

Cepa	CMI (mg/ml)	IC50 (mg/ml)	IC90 (mg/ml)
P31	3	0,75	3
C1211	3	< 3	3
BCN2	3	0,18	3
BCN3	6	1,5	6
TAA1	3	0,18	1,5

Tabla 10: resultados de CMI, IC50 e IC90 para el tratamiento con voriconazol.

Cepa	CMI (%)	IC50 (%)	IC90 (%)
P31	2	<0,12	0,5
C1211	2	<0,12	0,12
BCN2	0,5	<0,12	0,12
BCN3	>2	<0,12	<0,12
TAA1	2	<0,12	0,25

Curva de muerte

Se obtuvieron 15 curvas de muerte en total, exponiendo cada cepa con la cantidad mínima inhibitoria de cada antimicrobiano. En la figura 15 se muestran las curvas de muerte de la cepa P31 para todos los tratamientos, mientras que las curvas de las demás cepas se muestran en los anexos (figuras S5, S6, S7, S8). Tal y como se puede observar en la figura 15, todas las curvas muestran una tendencia descendente muy pronunciada, correspondiente a un rápido efecto amebicida del antibiótico en cuestión.

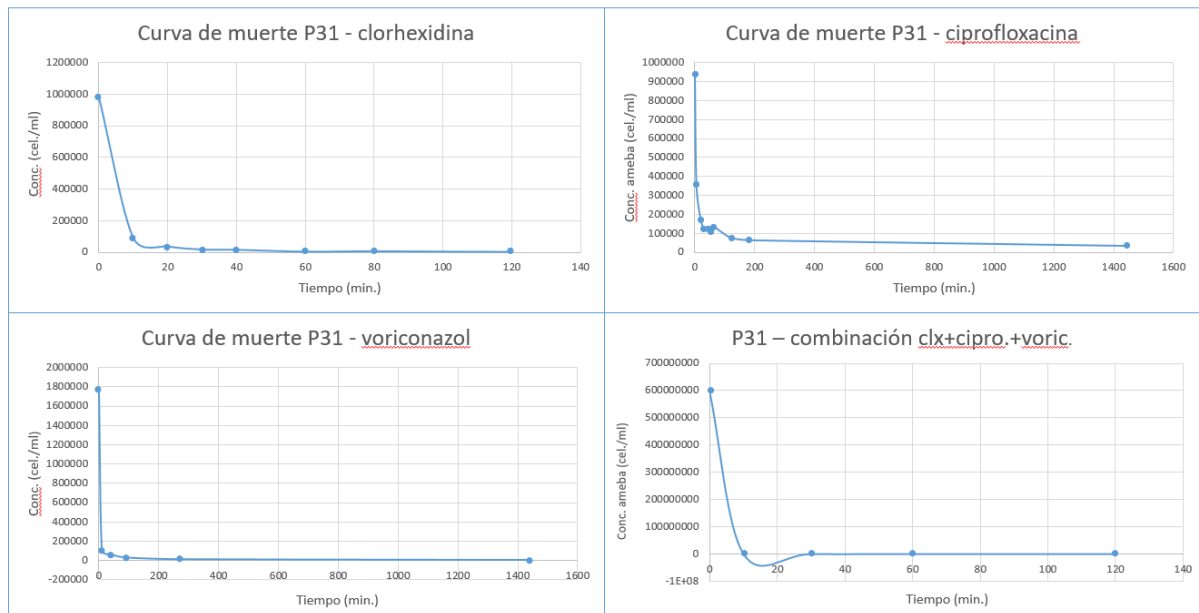


Figura 15: curvas de muerte para la cepa P31.

De forma similar a las curvas de vida, la muerte celular también sigue cinéticas de orden 1⁵⁰: $\ln C - \ln C_0 = -k (t - t_0)$. A partir de esta ecuación se calculó la constante de velocidad de la inactivación (k).

Por otro lado, también se calculó el tiempo de reducción decimal (D): $D = 2,303/k$, definido como el tiempo que se tarda en reducir la población en un logaritmo decimal.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos, junto con el tiempo necesario para conseguir la erradicación de la ameba si esto se llega a producir.

Tabla 11: parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de muerte.

Cepa	k (min ⁻¹)	D (min)	T. erradicación (min)
P31 – clorhexidina	1,63	1,41	30
C1211 – clorhexidina	0,13	17,85	55
BCN2 – clorhexidina	0,34	6,77	30
BCN3 – clorhexidina	0,47	4,88	20
TAA1 – clorhexidina	0,16	14,31	60
P31 – ciprofloxacina	0,08	29,60	-
C1211 – ciprofloxacina	0,26	8,95	-
BCN2 – ciprofloxacina	0,42	5,45	20
BCN3 – ciprofloxacina	0,16	14,02	-
TAA1 – ciprofloxacina	0,09	26,56	-
P31 – voriconazol	0,28	8,13	90
C1211 – voriconazol	0,62	3,72	10
BCN2 – voriconazol	0,06	40,83	-
BCN3 – voriconazol	0,23	9,85	10
TAA1 – voriconazol	0,20	11,61	-

Efecto post-tratamiento

El objetivo de los ensayos de efecto post-tratamiento (EPT) es observar cuánto tiempo tarda la ameba en recuperar su crecimiento tras haber estado en contacto con el antimicrobiano un tiempo determinado, que fue fijado según la curva de muerte obtenida para cada caso. Debido a la gran heterogeneidad en tiempos de contacto y dosis de tratamiento, las curvas de efecto post-tratamientos son muy diferentes entre sí, por lo que todas ellas se muestran en las figuras S9, S10, S11, S12 y S13 de los anexos. En líneas generales se puede observar un decrecimiento, seguido de un crecimiento en fase exponencial y la posterior fase estacionaria; cabe mencionar que en algunos casos la fase exponencial tarda en llegar, produciéndose una estabilización a concentraciones bajas de ameba.

A partir de los datos obtenidos mediante los ensayos de EPT se calculó la duración del EPT mediante la fórmula descrita por Mc. Donald⁵¹: $EPT = T - C$. Siendo T las horas que tarda en crecer un logaritmo decimal la ameba sometida a tratamiento y C las horas que tarda en crecer un logaritmo la ameba control. Estos resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: duración del EPT de las diferentes cepas frente a los antimicrobianos utilizados.

Cepa	EPT clorhexidina (h)	EPT ciprofloxacina (h)	EPT voriconazol (h)
P31	143	259,31	147,46
C1211	75,46	488,78	No crece 1 log
BCN2	No crece 1 log	91,36	347
BCN3	No crece 1 log	561,16	106,5
TAA1	No crece 1 log	No crece 1 log	No crece 1 log

Estudio de combinaciones entre antimicrobianos

A partir de los datos obtenidos de ensayos de “Checkboard” realizados con las diferentes combinaciones de antimicrobianos indicadas en la metodología, se calculó la concentración inhibitoria fraccional de cada antimicrobiano en la combinación (CIF) y el índice de la concentración inhibitoria fraccional de la combinación (ICIF)⁴⁴. El parámetro CIF corresponde a la CMI del antimicrobiano cuando se usa en combinación con otro antimicrobiano, en la combinación dividido entre la CMI del antimicrobiano cuando se utiliza de forma aislada, mientras que el ICIF es la suma de las CIF de los antimicrobianos implicados en la combinación. Los criterios que se siguen para la interpretación de los resultados son los siguientes: $ICIF \leq 0,5$ indica sinergia entre los compuestos, $ICIF > 0,5 - \leq 4$ indica que la combinación es indiferente e $ICIF > 4$ indica que la combinación es antagónica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Índices CIF e ICIF para las diferentes combinaciones de antimicrobianos estudiadas.

Cepa	Clx + cipro.	Clx + voric.	Cipro. + voric.	Clx + cipro. + voric.
P31	CIF _{CLX} =0,125%	CIF _{CLX} = 0,25%	CIF _{CIPRO} = 0,17 mg/ml	CIF _{CLX} = 0,25%
	CIF _{CIPRO} = 0,5 mg/ml	CIF _{VORIC} = 0,125%	CIF _{VORIC} = 0,25%	
	ICIF = 0,175%	ICIF = 0,375%	ICIF = 0,267%	
C1211	CIF _{CLX} =0,0625%	CIF _{CLX} = 0,125%	CIF _{CIPRO} = 0,25 mg/ml	CIF _{CLX} = 0,125%
	CIF _{CIPRO} = 0,5 mg/ml	CIF _{VORIC} = 0,25%	CIF _{VORIC} = 0,25%	
	ICIF = 0,1125%	ICIF = 0,375%	ICIF = 0,275%	
BCN2	CIF _{CLX} =0,125%	CIF _{CLX} = 0,125%	CIF _{CIPRO} = 0,25 mg/ml	CIF _{CLX} = 0,25%
	CIF _{CIPRO} = 0,5 mg/ml	CIF _{VORIC} = 0,5%	CIF _{VORIC} = 0,5%	
	ICIF = 0,175%	ICIF = 0,625%	ICIF = 0,525%	
BCN3	CIF _{CLX} =0,0625%	CIF _{CLX} = 0,25%	CIF _{CIPRO} = 0,125 mg/ml	CIF _{CLX} = 0,125%
	CIF _{CIPRO} = 0,25 mg/ml	CIF _{VORIC} = 0,125%	CIF _{VORIC} = 0,25%	
	ICIF = 0,0875%	ICIF = 0,375%	ICIF = 0,2625%	
TAA1	CIF _{CLX} = 0,25%	CIF _{CLX} = 0,25%	CIF _{CIPRO} = 0,25 mg/ml	CIF _{CLX} = 0,5%
	CIF _{CIPRO} = 0,5 mg/ml	CIF _{VORIC} = 0,125%	CIF _{VORIC} = 0,25%	
	ICIF = 0,3%	ICIF = 0,375%	ICIF = 0,275%	

La concentración mínima de clorhexidina que resultó eficaz en la erradicación de todas las cepas estudiadas en combinación con ciprofloxacina y voriconazol fue del 0,005%.

Para la combinación de los tres antimicrobianos se realizaron curvas de muerte utilizando la concentración de clorhexidina mencionada anteriormente, las cuales se muestran en las figuras S5, S6, S7 y S8 de los anexos. También se calcularon los parámetros k y D (tabla 14) de igual forma que en el estudio de curvas de muerte para los tratamientos con un único antimicrobiano.

Tabla 14: parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de muerte para el tratamiento combinatorio de clx.+cipro.+voric.

Cepa	k (min ⁻¹ .)	D (min.)
P31	0,57	4,04
C1211	0,43	5,29
BCN2	0,20	11,43
BCN3	0,26	8,56
TAA1	0,43	5,40

4.3 Estudio de bacterias endosimbiontes

La tabla 15 muestra la nomenclatura que se asignó a cada una de las cepas bacterianas aisladas como endosimbiontes de las amebas estudiadas.

Tabla 15: cepas de bacterias endosimbiontes de cada cepa de AVL estudiada.

Cepas <i>Acanthamoeba</i>	Cepas bacterianas
P31	P31b1, P31b2, P31b3, P31b4
C1211	C1211b1, C1211b2, C1211b3, C1211b4, C1211b5
BCN2	BCN2b
BCN3	BN3a, BCN3b, BCN3c
TAA1	TAA1A, TAA1B

Para cada cepa se realizó un antibiograma con los antibióticos descritos en el apartado metodología. En la tabla 16 se pueden observar los resultados obtenidos, expresados como diámetro del halo de inhibición; destaca los casos de P31b3 y C1211b5, para LAS que se observa achatamiento del halo indicativo de presencia de beta lactamasas inducibles.

Tabla 16: resultados del antibiograma realizado para las cepas de bacterias endosimbiontes de las AVL.

Cepa bacteria	Diámetro del halo (mm)			
	Estreptomycinina	Ampicilina	Ceftacidima	Imipenem
P31b1	0	0	30	30
P31b2	15	12	28	29
P31b3	13	11	28 (achatado)	29
P31b4	0	0	29	30
C1211b1	18	19	9	34
C1211b2	18	23	11	37
C1211b3	17	24	11	32
C1211b4	21	21	11	36
C1211b5	26	30	18 (achatado)	40
BCN2b	9	0	0	0
BCN3a	12	15	30	21
BCN3b	11	14	31	25
BCN3c	11	15	27	19
TAA1A	0	0	0	60
TAA1B	0	0	0	52

Según EUCAST ([v 14.0 Breakpoint Tables.pdf \(eucast.org\)](http://www.eucast.org/Download_center/files/v14.0/Breakpoint%20Tables.pdf)), se considera: Estreptomycinina, resistente con halo < 14 mm; Ampicilina, resistente < 14 sensible ≥14; Ceftacidima e Imipenem resistente < 19 sensible ≥22

Identificación de bacterias mediante MALDI-TOF

Se obtuvieron los espectros de masas de las bacterias y se compararon con la biblioteca de bacterias de referencia (figura 16).

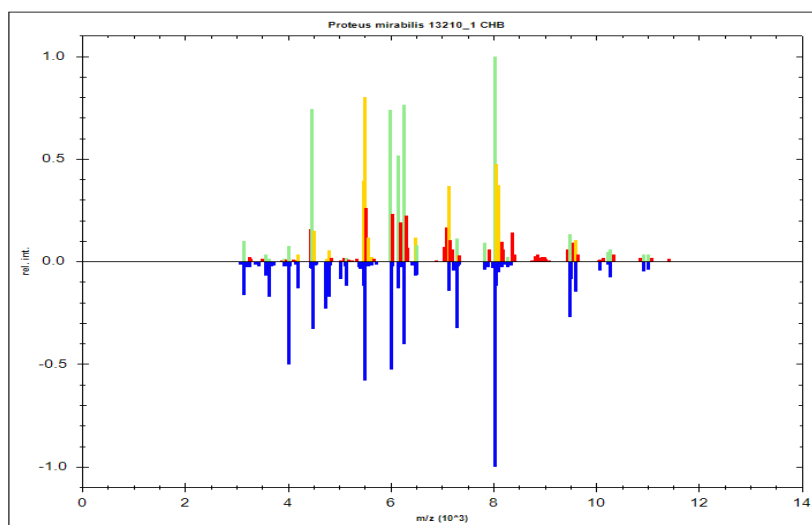


Figura 16: comparación de espectro de masas de la cepa de estudio (arriba.) con la cepa de referencia (abajo).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 17. Cabe mencionar que la identificación de las cepas TAA1A y TAA1B no fue posible puesto que no se encontró ninguna relación fiable con las bacterias de referencia.

Tabla 17: identificación de las cepas de bacterias endosimbiontes de las AVL.

Cepa bacteria	Especie
P31b1	<i>Escherichia coli</i>
P31b2	<i>Escherichia coli</i>
P31b3	<i>Escherichia coli</i>
P31b4	<i>Escherichia coli</i>
C1211b1	<i>Microbacterium arborescens / imperiale</i>
C1211b2	<i>Microbacterium arborescens / imperiale</i>
C1211b3	<i>Microbacterium arborescens / imperiale</i>
C1211b4	<i>Microbacterium arborescens / imperiale</i>
C1211b5	<i>Microbacterium arborescens / imperiale</i>
BCN2b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BCN3a	<i>Proteus mirabilis</i>
BCN3b	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
BCN3c	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
TAA1A	No identifica
TAA1B	No identifica

Búsqueda de genes de resistencia

En las bacterias aisladas, se procedió a la detección de integrones de clase 1, 2 y 3 mediante PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18. Por otro lado, las imágenes de PCR se pueden observar en las figuras S14, S15 y S16 en los anexos.

Tabla 18: integrones detectados para las cepas de bacterias endosimbiontes.

Cepa bacteria	Integrones
P31b1	Clases 1 y 3
P31b2	Clase 3
P31b3	Clase 3
P31b4	Clases 1 y 3
C1211b1	Clase 1
C1211b2	Clase 1
C1211b3	Clase 1
C1211b4	Clase 1
C1211b5	Clase 1
BCN2b	Clase 1
BCN3a	Clases 1 y 2
BCN3b	Clases 1, 2 y 3
BCN3c	Clases 1 y 2
TAA1A	Clases 2 y 3
TAA1B	Clase 3

Una vez detectada la presencia de integrones y determinado a que clase pertenecían, se llevaron a cabo nuevas PCR para su caracterización. Se caracterizaron los integrones de clase 1 (cebadores 5'CS-F y 3'CS-R) y los de clase 2 (cebadores attI2-F y orfX-R y cebadores Int2F y SuIR) (figuras S17, S18 y S19 anexos). La caracterización de los integrones de clase 3 no se llevó a cabo debido a que existe menos información acerca de ellos. De esta forma se pudieron encontrar los genes cassette de resistencia. Tal y como se puede observar en la tabla 19, se detectaron cuatro familias de genes de resistencia: *AadA*, *OXA*, *DfrA* y *sat*.

Tabla 19: caracterización de los integrones detectados en bacterias endosimbiontes.

Cepa	Identificación	Tamaño de banda (pb)	Integrón	Genes detectados
BCN3c	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2000	Clase 1	<i>AadA1</i> , <i>OXA-1</i>
P31b1	<i>Escherichia coli</i>	1000	Clase 1	<i>AadA3</i>
P31b4	<i>Escherichia coli</i>	1000	Clase 1	<i>AadA2</i> , <i>AadA1</i>
BCN3a	<i>Proteus mirabilis</i>	2000	Clase 2	<i>DfrA1</i> , <i>AadA1</i>
BCN3b	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2000	Clase 2	<i>DfrA1</i> , <i>sat2</i> , <i>aadA1</i>
BCN3c	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2000	Clase 2	<i>DfrA1</i> , <i>aadA1</i>

5. DISCUSIÓN

La importancia de las AVL en Salud Pública radica no solo en su potencial patogenicidad sino también en su capacidad para albergar bacterias potencialmente patógenas y resistentes a los antibióticos^{3,40}. Por ello el objetivo de la presente investigación se centró en la caracterización de un grupo de amebas de diferentes orígenes, el estudio de su respuesta a tratamientos nuevos para la queratitis y la identificación de sus bacterias endosimbiontes y caracterización de sus genes de resistencia a antibióticos.

5.1 Caracterización de cepas de *Acanthamoeba*

Tal y como se expone en el apartado de resultados (figura 11), la morfología de las cepas P31, C1211, BCN2, BCN3 y TAA1 se correspondió con la descrita por Page para *Acanthamoeba*¹. Las cepas P31 y C1211 ya estaban identificadas como *Acanthamoeba* por técnicas de Biología Molecular, habiéndose confirmado dicha identificación para las BCN2, BCN3 y TAA1.

El estudio de filogenética y las homologías halladas en la comparación de las cepas de *Acanthamoeba* con las registradas en el GenBank, las agrupan en torno al genotipo T4. Este genotipo es uno de los más frecuentemente encontrados⁵² y se han reportado casos de queratitis amebiana causada por este genotipo T4 de *Acanthamoeba*, los cuales suelen estar relacionados con individuos inmunodeprimidos⁵³, usuarios de lentillas⁵⁴ o con alguna lesión corneal¹².

En cuanto al análisis filogenético, en el apartado de resultados se comentó el alto porcentaje de homología entre las cepas BCN2 y BCN3, la cual es debida a que ambas proceden del mismo origen: fueron aisladas en un laboratorio en Barcelona. La cepa C1211 también presentó una gran homología, que es originaria del río Noguera Ribagorzana en Cataluña. Estos resultados no son de extrañar puesto a que las AVL son territoriales y las cepas BCN2 y BCN3 podrían tener un origen relacionado con el mismo río en el que se encuentra C1211. Por otro lado, la cepa P31 es originaria de Aragón y procede de agua de red clorada y expuesta a radiación solar, por lo que la distancia geográfica puede estar relacionada con la distancia filogenética. Otros estudios se evidencian la territorialidad de las AVL, como un trabajo previo de la Universidad de Zaragoza en el que al estudiar las AVL que habitaban la red de distribución del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, *Acanthamoeba* aparecía siempre en los mismos puntos del hospital en diferentes campañas⁵⁵.

La diferente morfología de la cepa LU4 (figura 12) impidió la identificación mediante claves morfológicas¹. Los estudios moleculares permitieron establecer la identidad de dicha cepa como *Paravahlkampfia*. Este hallazgo tiene relevancia, puesto que esta especie ha sido descrita como agente causal de meningoencefalitis y queratitis¹¹. Dado que esta cepa no fue capaz de crecer en medio axénico, no se continuó el estudio con ella.

Además, en este trabajo se estudia la capacidad de adaptación de las AVL a altas temperaturas y en presencia de agentes tóxicos para ellas, en este caso manitol en diferentes concentraciones. La resistencia a la temperatura y la osmotolerancia se consideran factores de patogenicidad indirectos²⁰. La mayor tolerancia implica, en principio, una mayor patogenicidad, aunque esta apreciación no es definitiva ya que existen muchos otros factores de virulencia que pueden estar presentes.

Los ensayos de termotolerancia revelaron gran capacidad de adaptación y crecimiento a altas temperaturas de las cepas estudiadas, excepto para la cepa BCN3 a 45°C, que permaneció viable, por lo que sería capaz de resistir esta temperatura para después crecer una vez ésta baje.

Por último, todas las cepas estudiadas mostraron capacidad de adaptación y crecimiento al ser expuestas a manitol 0,1M. Al ser expuestas a manitol 0,3M, todas las cepas menos la BCN3 mostraron capacidad de adaptación y crecimiento. En cambio, para concentraciones de manitol de 1M solo mostraron crecimiento las cepas P31, C1211 y TAA1.

La gran capacidad de adaptación de las cepas P31, C1211 y TAA1 se debe a su origen ambiental, han sido expuestas a cloración y radiación solar y de esa forma han adquirido la capacidad de permanecer viables en ambientes desfavorables. Por otro lado, la adquisición de una queratitis precisa de un contacto continuado y una lesión previa²⁷. En el caso de uso de lentes de contacto, los buenos hábitos y la correcta higiene son de gran importancia para evitar la queratitis amebiana.

Por otra parte, está comprobado que otros factores como la composición de los quistes o el diferente crecimiento de las amebas puede determinar el éxito en procesos de desinfección, y también de los tratamientos de la queratitis amebiana⁵⁶. Por ello, en este trabajo se determinó la velocidad de crecimiento de las diferentes amebas que se han utilizado. La velocidad del crecimiento viene regida por la constante específica de velocidad de crecimiento (μ) (tabla 7); cuanto mayor sea el valor de esta constante, la velocidad de crecimiento será más alta.

Observando los valores de las constantes obtenidos a partir de las curvas de vida, se puede concluir que la cepa C1211 es la que muestra el crecimiento más rápido, seguida de las cepas TAA1, BCN2, P31 y siendo la cepa BCN3 aquella con el crecimiento más lento.

Para proporcionar un correcto tratamiento es importante analizar el tiempo que tardan las cepas en llegar a las diferentes fases de crecimiento (tabla 6). En primer lugar, es importante mencionar que la cepa C1211 es la que posee una fase de latencia más larga (9 días), seguida de TAA1 (4 días), P31 (3 días) y por último las cepas BCN2 y BCN3 (1 día), siendo estas últimas las que tardaron menos en llegar a la fase exponencial. Por otro lado, destaca que el tiempo que tardan las cepas en llegar a la fase estacionaria sigue el mismo orden, siendo C1211 la que más tarda y las cepas BCN2 y BCN3 las que menos tardan. El tratamiento debería proporcionarse antes de que la ameba llegue a la fase exponencial, y prolongarse durante el tiempo suficiente para garantizar que ninguna de ellas alcance la fase de quiste, lo que incrementaría el riesgo de recrecimiento. Sin embargo, establecer unas pautas de tratamiento puede ser difícil en base a los resultados obtenidos.

Normalmente, se requiere un inóculo bajo para establecer una infección. Al estar *Acanthamoeba* presente en el medio ambiente, la población humana tiene contacto frecuente con ésta y todos disponemos de anticuerpos frente a ella. En las infecciones se produce un cúmulo de circunstancias en las que una inmunodepresión junto con una lesión y el contacto continuado con la ameba da lugar a la infección⁵⁷. El tratamiento temprano es importante para la erradicación de la enfermedad.

5.2 Estudio de efectividad de tratamientos

En primer lugar, se ha comparado la respuesta de las diferentes cepas a cada tipo de tratamiento (tablas 8, 9 y 10):

- Para el tratamiento con clorhexidina, las cepas C1211 y BCN3 muestran mayor resistencia, puesto que sus CMI's son las más altas (0,04%). Por otro lado, la cepa TAA1 ha sufrido erradicación total a menor concentración de clorhexidina (0,01%). Destaca que aun siendo la CMI de la cepa C1211 de las más altas, la IC₅₀ e IC₉₀ son bajas, implicando la permanencia de solo unos pocos quistes viables a las concentraciones más altas.
- Para el tratamiento con ciprofloxacina, las CMI's se mantuvieron más homogéneas, únicamente destacando la cepa BCN3, que mostró una mayor resistencia, presentando una CMI más alta (6 mg/ml).
- Para el tratamiento con voriconazol destaca que no se consigue la erradicación total de la cepa BCN3 en el rango de concentraciones estudiado. Por otro lado, la cepa más sensible es la BCN2 con una CMI de 0,5%.

Para definir qué agente antimicrobiano resultaría más efectivo es necesario analizar las curvas de muerte. Con estos ensayos sólo se puede confirmar que, tras un contacto de 24 horas, todos los agentes han conseguido la erradicación de las amebas, excepto el voriconazol con la cepa BCN3. Cabe destacar que, para todos los agentes, excepto para

ciprofloxacina la IC₉₀ se alcanza a bajas concentraciones, pero la erradicación requiere concentraciones mucho más altas.

Para determinar la eficacia de los tratamientos, se determinó la curva de muerte de cada tratamiento para todas las cepas. Como se puede ver en la tabla 11, la velocidad de los tratamientos depende de cada cepa estudiada. Para sacar conclusiones es necesario realizar la comparación de las constantes de velocidad de inactivación (k) (tabla 11). Cuanto mayor sea el valor de k , la muerte celular habrá sucedido de forma más rápida y por lo tanto el tratamiento habrá resultado más efectivo.

Las cepas estudiadas mostraron resultados muy heterogéneos para cada antimicrobiano utilizado, por lo que se compara la efectividad de cada tratamiento para las diferentes cepas:

- El tratamiento con clorhexidina fue más efectivo para la cepa P31, que mostró una muerte celular más rápida, seguida de las cepas BCN3, BCN2, TAA1 y C1211 en orden decreciente de velocidad de inactivación. Se ha conseguido la erradicación de todas las cepas.
- El tratamiento con ciprofloxacina fue más efectivo para la cepa BCN2, que mostró una muerte celular más rápida, seguida de las cepas C1211, BCN3, TAA1 y P31 en orden decreciente de velocidad de inactivación. Sólo se ha conseguido la erradicación de la cepa BCN2.
- El tratamiento con voriconazol fue más efectivo para la cepa C1211, que mostró una muerte celular más rápida, seguida de las cepas P31, BCN3, TAA1 y BCN2 en orden decreciente de velocidad de inactivación. Se ha conseguido la erradicación de las cepas P31, C1211 y BCN3.

Finalmente, el estudio del Efecto Post-Tratamiento informa sobre las posibilidades de recrecimiento de la ameba una vez retirado el tratamiento.

Al comparar la duración de efecto post-tratamiento (tabla 12), se puede concluir que el recrecimiento es menos frecuente al utilizar el tratamiento con clorhexidina, siendo éste más frecuente para el tratamiento con ciprofloxacina, aunque para algunas cepas el recrecimiento tarda más en darse que para el tratamiento con clorhexidina.

En cuanto a la comparación entre cepas, destaca la TAA1 que no registra recrecimiento de 1 logaritmo después de aplicar cada uno de los tres tratamientos. Las cepas BCN2 y BCN3 no registran recrecimiento de 1 logaritmo después de ser tratadas con clorhexidina: la cepa BCN2 registró menor tiempo de recuperación después de ser tratada con ciprofloxacina, mientras que la cepa BCN3 registró su menor tiempo para el tratamiento con voriconazol. También cabe mencionar que la cepa C1211 no registró recrecimiento de 1 logaritmo al ser tratada con voriconazol, mientras que utilizando clorhexidina registró el menor tiempo de recuperación de todos (75,46h).

Por otro lado, la cepa P31 registró tiempos de recrecimiento en torno a los 6-9 días, siendo este tiempo de recuperación más bajo para clorhexidina, seguido de voriconazol y ciprofloxacina en orden creciente.

Finalmente, se puede concluir que la cepa P31 es más resiliente frente a todos los tratamientos estudiados, mientras que la cepa TAA1 resulta la más sensible.

Se comprueba de esta forma que la diferencia entre las cepas es importante para que un tratamiento tenga éxito. Dado que los trofozoítos siempre son muy sensibles frente a los agentes antimicrobianos utilizados e incluso a los agentes físicos, la diferencia la marca la resistencia de los quistes, compuestos por celulosa fundamentalmente¹⁶. La clorhexidina se muestra como el agente más efectivo, capaz de eliminar incluso las bacterias endosimbiontes que se liberan tras la muerte de las células amebianas. La clorhexidina tiene un mecanismo de acción similar a las sales de amonio cuaternario, por lo que afecta a la pared de los quistes produciendo su rotura y cuando penetra produce la necrosis celular²⁴, tal como se puede observar en la figura 17.

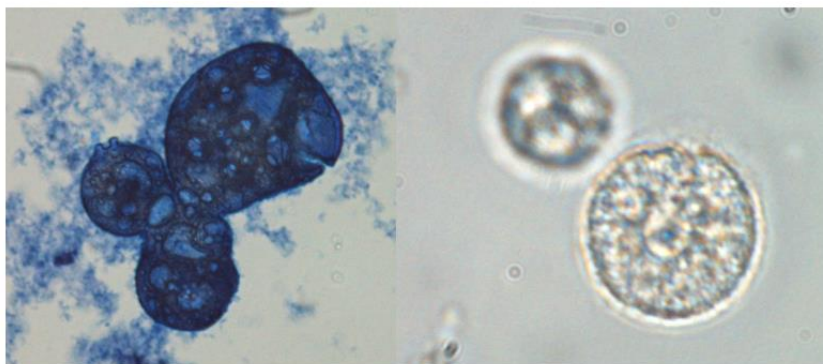


Figura 17: *Acanthamoeba* (cepa P31) antes (dcha.) y después (izda.) del tratamiento con clorhexidina.

La ciproflofloxacina tiene como órgano diana las topoisomerasas implicadas en la replicación del ADN⁵⁸, por lo que el mecanismo de actuación frente a las amebas es en principio desconocido, aunque fue elegido para el tratamiento en trabajos previos²⁷ tras demostrar su eficacia *in vitro*. Es posible que al tratarse la ciprofloxacina de forma aislada, ésta se dirija principalmente a las bacterias endosimbiontes de las AVL.

Estudio de combinaciones entre antimicrobianos

Los datos de ICIF que se muestran en la tabla 13 son menores o aproximados a 0,5%, por lo tanto, se concluye que las combinaciones de antimicrobianos actúan siguiendo un mecanismo sinérgico (bibliografía).

Se dice que una combinación de dos o más antimicrobianos es sinérgica cuando sus efectos combinados son mayores que la suma de los efectos que se observan al administrarse cada antimicrobiano por separado⁵⁹.

Al realizar el ensayo de "Checkboard" de las diferentes sinergias se pudo observar que los resultados obtenidos seguían la forma característica de un mecanismo sinérgico (figura 18), en la que los cuadrados sombreados corresponden a amebas vivas encontradas, mientras que los blancos corresponden a erradicación amebiana.

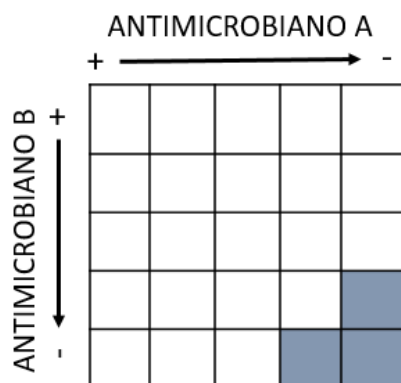


Figura 18: esquema de resultados para ensayos de "Checkboard".

Debido a la agresividad de los tratamientos actuales para la queratitis y su prolongación en el tiempo, las sinergias encontradas ofrecen posibilidad de un tratamiento mucho más efectivo, siendo las concentraciones encontradas para el tratamiento efectivo: 0,0025% clx + (0,75-1,5 mg/ml) cipro.; (0,0025-0,01%) clx + (0,25-0,5%) voric.; y 0,005% clx + 0,75 mg/ml cipro. + 0,25% voric. Esto reduce notablemente la concentración de clorhexidina utilizada, con lo que se reduce la agresividad del tratamiento. La mayor ventaja de este tratamiento es que los compuestos a utilizar ya existen en formato colirio, a excepción de la clorhexidina que es preparado farmacéutico.

Observando los resultados, parece razonable pensar que la acción de la clorhexidina puede provocar roturas en la pared de los quistes que favorezca la entrada de otros agentes, facilitando su acción.

Tal y como se comentó en el apartado de resultados, se realizaron curvas de muerte para la combinación de los tres antimicrobianos estudiados. A partir de las constantes de inactivación calculadas se puede concluir que la cepa que mostró una muerte celular más rápida fue la P31, seguida de C1211, TAA1, BCN3 y BCN2. Por otro lado, al comparar estos parámetros de velocidad con aquellos pertenecientes al tratamiento únicamente con clorhexidina se puede concluir que la mejora o empeoramiento en la velocidad de erradicación depende de la cepa estudiada; mejorando ésta para las cepas C1211E y TAA1, y empeorando para las demás. No obstante, al haber conseguido la erradicación de las amebas, con una menor concentración de clorhexidina aconseja su utilización, siempre considerando que los resultados que se obtengan *in vitro* pueden diferir de los que se encuentren *in vivo*, por lo que sería necesario su estudio en modelos animales.

5.3 Estudio de bacterias endosimbiontes

El estudio de las bacterias endosimbiontes de las cepas de *Acanthamoeba* resulta de interés dado que se ven protegidas por la forma de resistencia de las amebas y de esta forma consiguen atravesar procesos de depuración, potabilización y desinfección para llegar a los sistemas artificiales de agua, como las redes de distribución, piscinas, spas etc. Una vez que la ameba ha colonizado el sistema de agua, las bacterias, si encuentran las condiciones adecuadas pueden colonizar la instalación. En este trabajo se estudian las bacterias endosimbiontes de las amebas seleccionadas, con el fin de determinar su posible patogenicidad y su capacidad para portar genes de resistencia a los antibióticos.

Entre las limitaciones que presenta este estudio, es necesario aclarar que solamente se obtienen bacterias que de rápido crecimiento en condiciones aerobias a 37°C y en agar nutritivo. No se incluyen, por lo tanto, cualquier bacteria que crezca en otras condiciones o que sea no cultivable, como puede ser el caso de *Legionella* o *Mycobacterium*, bacterias habitualmente encontradas como endosimbiontes de amebas⁶⁰.

Se realizó un antibiograma de las cepas bacterianas obtenidas previo a su identificación para evaluar su interés clínico. Entre los resultados destaca la resistencia de las cepas P31b1 y P31b4 a estreptomicina y ampicilina; la resistencia de la cepa BCN2b a ampicilina, ceftacidima e imipenem; la resistencia de las cepas BCN3a, BCN3b y BCN3c a estreptomicina; y la resistencia de las cepas TAA1A y TAA1B a estreptomicina, ampicilina y ceftacidima.

Destaca la forma achatada en el halo de inhibición de ceftacidima en la zona próxima a imipenem para las cepas P31b3 y C1211b5, lo cual evidencia la presencia de una betalactamasa inducible⁶¹. Contrasta que en la caracterización de integrones para las cepas P31b3 y C1211b5 no se manifiesta esta betalactamasa, aunque cabe mencionar que los mecanismos de resistencia no siempre se encuentran en los integrones y para que se expresara este mecanismo habría que haber crecido las bacterias en presencia de beta lactámicos.

La identificación de bacterias mediante MALDI-TOF MS resulta un método muy rápido y preciso, pero tiene una importante limitación: las bacterias de referencia que componen las bibliotecas son de origen clínico; por lo que la determinación de cepas de origen ambiental no suele dar resultados fiables, ya que se carece de la referencia apropiada en la biblioteca de espectros. Es por este motivo que la determinación de las cepas TAA1A y TAA1B no fue posible, sugiriendo que se trata de bacterias ambientales no patógenas para el hombre ambiental (agua de red).

Después de la identificación se obtuvieron cinco especies diferentes de bacteria:

- *Escherichia coli* (P31b1, P31b2, P31b3, P31b4): bacilo gram-negativo de origen clínico. Es la bacteria predominante en la microbiota humana, no suele ser

patógena, pero en casos puntuales puede dar lugar a patologías como la diarrea del viajero o colitis hemorrágica⁶².

- *Microbacterium arborescens/imperial* (C1211b1, C1211b2, C1211b3, C1211b4, C1211b5): bacilo gram-positivo⁶³. Suelen ser de origen medioambiental y no suelen ser patógenas, aunque se han descrito casos de bacteriemia producida por este tipo de bacterias⁶⁴.
- *Stenotrophomonas maltophilia* (BCN2b): bacteria gram-negativa. Es patógena y supone una causa importante de infección nosocomial en individuos inmunodeprimidos. Aunque está considerada una bacteria de origen medioambiental, las fuentes y reservorios de las que proceden no suelen ser conocidos⁶⁵.
- *Proteus mirabilis* (BCN3a): bacilo gram-negativo de origen clínico con actividad ureasa, asociada a infecciones urinarias⁶⁶.
- *Citrobacter amalonaticus* (BCN3b, BCN3c): bacilo gram-negativo. Es un patógeno oportunista que produce infecciones nosocomiales, usualmente infecciones urinarias, peritonitis y cuadros similares a fiebre tifoidea⁶⁷.

Sobre todo, en el caso de bacterias intracelulares, las amebas pueden actuar como reservorio, en ocasiones difícil de localizar, como ocurre en los brotes de legionelosis, o con algunas micobacterias, como *Mycobacterium ulcerans*, que causa úlcera de Buruli⁶⁸.

Las AVL son capaces de albergar bacterias y protegerlas de tratamientos de desinfección. En este trabajo se ha confirmado la presencia de bacterias endosimbiontes en las AVL, cuya importancia reside en la patogenicidad y la resistencia a antibióticos de las mismas. Muchas veces las infecciones amebianas se “enmascaran”; en primer lugar, se detecta una infección bacteriana y cuando no funcionado los tratamientos propuestos se descubre una queratitis amebiana. Esto puede suponer un agravio en la patología del paciente y una pérdida de un tiempo que es crucial para el tratamiento⁶⁹.

Tal y como se ha estudiado, las bacterias endosimbiontes de las AVL son capaces de adquirir y expresar genes de resistencia a diferentes antibióticos, lo cual puede suponer un grave problema para la Salud Pública, ya que algunas de estas bacterias son patógenas y encontrarse dentro de las amebas les facilita la infección al hospedador de la ameba. En cuanto a lo estudiado en este trabajo, cabe destacar la confirmación de los resultados del antibiograma al encontrar genes cassette de resistencia a la estreptomicina en las cepas P31b1 y P31b4.

Respecto a los genes de resistencia, en este trabajo solamente se estudia la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3, por ser los más habituales y por tratarse de elementos genéticos móviles. Su capacidad para transmitirse entre plásmidos y genoma bacteriano

y entre bacterias los hace especialmente importantes. La presencia de estos integrones no impide la coexistencia de otros mecanismos de resistencia, que no han sido buscados en este trabajo y que por lo tanto constituye una expectativa de futuro.

Todas las cepas, excepto la TAA1B mostraron presencia de integrones. Se ha identificado la presencia mayoritaria de integrones de Clase 1, seguido de los de Clase 2 y los de Clase 3. Los de Clase 3 no fueron estudiados con más profundidad al no existir referencias que permitan su estudio en el tiempo dedicado a este trabajo

Al estudiar los genes de resistencia contenidos en estos integrones solo se consigue amplificación positiva para 5 de ellas, identificando genes de las siguientes familias:

- Genes de la familia *AadA*: aminoglucosido-adenil transferasas que codifican resistencia a estreptomycin y espectinomycin⁷⁰.
- Genes de la familia *OXA*: beta-lactamasas que codifican resistencia a beta-lactámicos, en concreto, el gen *OXA-1* codifica resistencia a oxacilina, aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas; así como a los inhibidores de beta-lactamasas como el ácido clavulánico⁷¹.
- Genes de la familia *DfrA*: dihidrofolato-reductasas que codifican resistencia a trimetoprim⁷².
- Genes de la familia *sat*: estreptotricin-acetiltransferasas que codifican resistencia a estreptotricina⁷³.

La presencia de los integrones con estos cassetes de resistencia a antibióticos se traduce según se ha visto en los antibiogramas, observándose resistencia a la estreptomycin en las cepas P31b1, P31b4, BCN3a, BCN3b y BCN3c.

La presencia de bacterias portadoras de integrones en el interior de las amebas muestra que estas son un reservorio ambiental a considerar en la lucha contra la llamada “pandemia del siglo XXI”, en la que se intenta controlar la diseminación de genes de resistencia frente a los antibióticos. Hasta la fecha las iniciativas en esta lucha han considerado, desde la perspectiva “One Health” la influencia en la diseminación de los genes de resistencia de las actividades humanas y ganaderas, y es ahora cuando se empieza a considerar la influencia del medioambiente. No obstante, este trabajo demuestra que las relaciones entre los microorganismos que conforman los diferentes hábitats es algo importante a tener en cuenta.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. Todas las cepas de AVL de estudio se identificaron como *Acanthamoeba* spp. genotipo T4, excepto la cepa LU4 que se identificó como *Paravahlkampfia*, estando todas ellas descritas como potencialmente patógenas.
2. Se ha evidenciado la gran heterogeneidad que existe en el crecimiento de las diferentes cepas de *Acanthamoeba* y sus factores de patogenicidad, lo cual pone de manifiesto la gran importancia de la investigación de cepas diferentes de AVL, sobre todo para la investigación de tratamientos o procesos de desinfección.
3. La combinación 0,005% clorhexidina + 0,75 mg/ml ciprofloxacina. + 0,25% voriconazol se mostró efectiva frente a todas las cepas estudiadas, consiguiendo la erradicación de las mismas con un tiempo de contacto de 30 minutos.
4. Se han identificado bacterias endosimbiontes potencialmente patógenas de las cepas de *Acanthamoeba* estudiadas.
5. Se han conseguido caracterizar genes cassette de resistencia a antibióticos localizados en integrones de las bacterias endosimbiontes de las cepas de *Acanthamoeba* estudiadas, lo cual evidencia que las AVL actúan como reservorios de resistencias antibacterianas que pueden suponer un problema para la Salud Pública.

7. CONCLUSIONS

The conclusions of this study are the following:

1. All the studied free-living amoeba strains were identified as *Acanthamoeba* spp. genotype T4, except the LU4 strain that was identified as *Paravahlkampfia*, all of which were described as potentially pathogenic.
2. The great heterogeneity that exists in the growth of different strains of *Acanthamoeba* and their pathogenicity factors has been demonstrated, which highlights the great importance of research into different strains of free-living amoeba, especially for research into treatments or disinfection processes.
3. The combination 0.005% chlorhexidine + 0.75 mg/ml ciprofloxacin. + 0.25% voriconazole was effective against all the strains studied, achieving their eradication with a contact time of 30 minutes.
4. Potentially pathogenic endosymbiont bacteria of the *Acanthamoeba* strains studied have been identified.
5. Antibiotic resistance cassette genes located in integrons of the endosymbiont bacteria of the *Acanthamoeba* strains studied have been characterized, which shows that free-living amoeba act as reservoirs of antibacterial resistance that can pose a problem for Public Health.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Page FC. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. 1988.
2. Bowers B, Korn ED. Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba castellanii*. The Journal of Cell Biology [Internet]. 1973 Dec 1 [cited 2022 Jun 26];59(3):784–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4357463/>
3. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. International Journal for Parasitology. 2004 Aug;34(9):1001–27.
4. KHAN NA, SIDDIQUI R. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. Parasitology. 2014 Feb 5;141(7):869–74.
5. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. Pathologie Biologie. 2012 Dec;60(6):399–405.
6. Marciano Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clinical Microbiology Reviews. 2003;16 (2):273–307.
7. Bertelli C, Greub G. Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2012;2.
8. Clarke M, Lohan AJ, Bernard Haochih Liu, Ilias Lagkouvardos, Scott William Roy, Zafar N, et al. Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. GenomeBiologycom (London Print). 2013 Feb 1;14(2)
9. Schmitz-Esser S, Toenshoff ER, Haider S, Heinz E, Hoenninger VM, Wagner M, et al. Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* Isolates. American Society for Microbiology. 2008 Sep 15;74(18):5822–31.
10. Rayamajhee B, Subedi D, Peguda HK, Willcox MD, Henriquez FL, Carnt N. A Systematic Review of Intracellular Microorganisms within *Acanthamoeba* to Understand Potential Impact for Infection. Pathogens [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Apr 21];10(2):225. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/2/225>
11. VISVESVARA GS, SRIRAM R, QVARNSTROM Y, BANDYOPADHYAY K, DA SILVA AJ, PIENIAZEK

NJ, et al. *Paravahlkampfia francinaen. sp.* Masquerading as an Agent of Primary Amoebic Meningoencephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2009 Jul;56(4):357–66.

12. Soykan Ozkoc, Sema Tuncay, Songul Bayram Delibas, Ciler Akisu, Zeynep Ozbek, Durak I, et al. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia sp.* from two clinical samples. *Journal of Medical Microbiology/Journal of medical microbiology*. 2008 Mar 1;57(3):392–6.

13. Castrillón J, Orozco L. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Rev. Chilena Infectol*. 2013;30(2):147–55.

14. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistologica*. 1977; 13:557–98.

15. Putaporntip C, Kuamsab N, Nuprasert W, Rojrung R, Pattanawong U, Tia T, et al. Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis sp. nov.* *Scientific Reports*. 2021 Aug 27;11(1).

16. Fernández MT. Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza; 2015.

17. Bradbury RS, French LP, Blizzard L. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2022 May 17];86(3):178–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670114000218>

18. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - DPDx - Free Living Amebic Infections [Internet]. [www.cdc.gov](https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html). 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>

19. Shaheen M, Scott C, Ashbolt NJ. Long-term persistence of infectious *Legionella* with free-living amoebae in drinking water biofilms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2019 May;222(4):678–86.

20. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites & Vectors [Internet]. 2012 Jan 10;5(6):6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3284432/>
21. Sissons J, Kim KS, Stins M, Jayasekera S, Alsam S, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. Infection and Immunity [Internet]. 2005 May 1 [cited 2020 Aug 18];73(5):2704–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845472/>
22. He YG, Niederkorn JY, McCulley JP, Stewart GL, Meyer DR, R. Silvany, et al. In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. PubMed. 1990 Nov 1;31(11):2235–40.
23. Khan NA, Tareen NK. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. Folia Parasitologica [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2020 Aug 18];50(2):97–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14560969/>
24. Remacha V, Rubio E, Chueca P, Beltran A, Ormad MP, Goñi P. Aproximación al mecanismo de actividad de clorhexidina frente a *Acanthamoeba* para el tratamiento de la queratitis amebiana. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Zaragoza 2024.
25. Por YM, Mehta JS, Chua JLL, Koh TH, Khor WB, Fong ACY, et al. *Acanthamoeba* Keratitis Associated with Contact Lens Wear in Singapore. American Journal of Ophthalmology. 2009 Jul;148(1):7-12.
26. Knickelbein JE, Kovarik J, Dhaliwal DK, Chu CT. *Acanthamoeba* keratitis: a clinicopathologic case report and review of the literature. Human Pathology [Internet]. 2013 May 1 [cited 2020 Aug 18];44(5):918–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23332929/>
27. Ángel Ortillés, Goñi P, Rubio E, Sierra M, Ekaterina Gámez, Fernández MT, et al. A Rabbit Model of *Acanthamoeba* Keratitis: Use of Infected Soft Contact Lenses After Corneal Epithelium Debridement with a Diamond Burr. Investigative ophthalmology & visual science. 2017 Feb 20;58(2):1218–8.
28. Graffi S, Peretz A, Jabaly H, Koiefman A, Naftali M. *Acanthamoeba* keratitis: study of the 5-year incidence in Israel: Table 1. British Journal of Ophthalmology. 2013 Jul 22;97(11):1382–3.

29. Pérez-Irezábal J, Martínez I, Isasa P, Barrón J. Queratitis por *Acanthamoeba*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2006 Oct; 24:46–52. Available from: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Acantha.pdf>
30. Cruz M, Ortiz J, Ladrón de Guevara C. Estudio clínico-microbiológico de tres casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. Enfermedades emergentes. 2004;6(2):98–102.
31. Büchele MLC, Nunes BF, Filippin-Monteiro FB, Caumo KS. Diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* Keratitis: A scoping review demonstrating unfavorable outcomes. Contact Lens and Anterior Eye [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2023 Oct 30];46(4):101844. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1367048423000486>
32. Sunada A, Kimura K, Nishi I, Toyokawa M, Ueda A, Sakata T, et al. In Vitro Evaluations of Topical Agents to Treat *Acanthamoeba* Keratitis. Ophthalmology. 2014 Oct;121(10):2059–65.
33. Hooper DC, Wolfson JS, EY N, Swartz MN. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. The American Journal of Medicine. 1987 Apr 1;82 (4A):12–20.
34. Cannas S, Usai D, Pinna A, Benvenuti S, Tardugno R, Donadu M, et al. Essential oils in ocular pathology: an experiment study. J Infect Dev Ctries. 2015;9 (6):650–4.
35. Buey del, Cristóbal JA, Casas P, Goñi P, Clavel A, Mínguez E, et al. Evaluation of In Vitro Efficacy of Combined Riboflavin and Ultraviolet A for *Acanthamoeba* Isolates. American Journal of Ophthalmology. 2012 Mar 1;153(3):399–404.
36. Aqeel Y, Siddiqui R, Khan NA. Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii*. Parasitology Research. 2012 Dec 28;112(3):1221–7.
37. Sabaté M, Prats G. Estructura y función de los integrones. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2002 Jan;20(7):341–5.
38. World Health Organization. One Health Global [Internet]. www.who.int. 2023. Available from: https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1
39. Winiecka-Krusnell J. Free-living Amoebae Protecting *Legionella* in Water: The Tip of an Iceberg? 1999 Jan 1;31(4):383–5.
40. Solana JC, Millana E, Rodríguez D. Implicaciones sanitarias de los protozoos como reservorio

de *Legionella* spp. Revista Reduca. 2013;5(3).

41. García A. Amebas de vida libre en muestras ambientales y humanas: caracterización molecular y relación con bacterias potencialmente patógenas, factores de virulencia y mecanismos de resistencia en *Acanthamoeba*. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza. 2013.

42. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. Parasitology Research [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2023 Oct 18];92(5):405–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14760525/>

43. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. Journal of Clinical Microbiology. 2001 May 1;39(5):1903–11.

44. Mansilla E, Cantón R, María M, Morosini I, Andrés R, Blasco C, et al. Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos [Internet]. Protocolo SEIMC. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento70.pdf>

45. Beltrán A. Utilidad de MALDI-TOF MS en la identificación de garrapatas de interés médico. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza. 2023.

46. Firoozeh F, Mahluji Z, Khorshidi A, Zibaei M. Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in clinical multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2019 Mar 29;8(1).

47. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrons: an Antibiotic Resistance Gene Capture and Expression System. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2000 Jan 11;38(6).

48. Wagner C. Aislamiento y caracterización molecular de amebas de vida libre en Venezuela. Tesis Doctoral Universidad de la Laguna. 2017.

49. Arana I, Orruño M, Barcina I. Como abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Tema 4: Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del País Vasco.

50. Coronel CP, Jiménez MT. Modelos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana

en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009;3(Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla. San Andrés Cholula, Pue., México):11–23.

51. García JA, Cantón R, Gomez-Lus ML, Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vols. 12. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

52. Del M, Marcelo Rodríguez Fermepín, Florencia Gracia Martínez, Sixto Raúl Costamagna. Presencia de *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina = Presence of *Acanthamoeba* spp. in watering trough in La Pampa province, Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 2017 Sep 1;49(3).

53. Rodríguez D, Retana L, Abrahams E. *Acanthamoeba* genotype T4 keratitis in a patient with Thygeson's superficial punctate keratitis. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica. 23:33–6.

54. Astorga B, Küstersch C, Weitz Jc. [The first isolation in Chile of a free life amoeba in a user of contact lenses with severe keratitis]. PubMed. 1993 Nov 1;121(11):1340–1.

55. Tovar Aguirre O., Aislamiento e identificación de amebas de vida libre en el sistema de agua del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" y su interrelación con *Legionella pneumophila*. Tesis doctoral Universidad de Zaragoza. 2006.

56. Magnet Á. Epidemiología y diagnóstico de amebas de vida libre implicadas en salud humana. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid. 2014.

57. Martínez AJ, Janitschke K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: A review. Infection: a Journal of Infectious Diseases. 1985 Nov; 13:251–6.

58. Hangan A, Aasmets K, Kekäläinen NJ, Paloheinä M, Pohjoismäki JL, Gerhold JM, et al. Ciprofloxacin impairs mitochondrial DNA replication initiation through inhibition of Topoisomerase 2. Nucleic Acids Research [Internet]. 2018 Oct 12;46(18):9625–36. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/46/18/9625/5088042>

59. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/sinergico> [Internet]. www.cancer.gov. 2011. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/sinergico>
60. Winiecka-Krusnell J. Free-living Amoebae Protecting *Legionella* in Water: The Tip of an Iceberg? 31. 1999 Jan 1;31(4):383–5.
61. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimientos SEIMC. 2011;38. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos.
62. Abdela W. Characterization of Diarrheagenic *Escherichia Coli* Serotypes Isolated from Poultry and Humans. SOJ Veterinary Sciences. 2017 Jan 16;3(1):1–8.
63. Podstawka A. *Microbacterium arborescens* | Type strain | DSM 20754, ATCC 4358, IFO 3750, NBRC 3750, NRRL B-24239, JCM 5884, CGMCC 1.1937, CIP 55.81, HAMBI 1892, IAM 1311, KCTC 3522, LMG 4009, NCDO 2276, NCIMB 8185, VKM Ac-1944 | BacDiveID:7370 [Internet]. bacdiv.dsmz.de. [cited 2024 Jul 8]. Available from: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/7370>
64. Kesarwani V, Kesarwani D, Kesarwaani S, Kumar A. RARE CAUSE OF BACTERAEMIA: *MICROBACTERIUM ARBORESCENS*. INDIAN JOURNAL OF APPLIED RESEARCH. 2021 Jun 1;10–1.
65. Denton M, Kerr KG. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews. 1998 Jan;11(1):57–80.
66. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. EcoSal Plus [Internet]. 2018 Feb 8;8(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5880328/>
67. Citrobacter [Internet]. Fundación iO. Available from: <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/bacterias/citrobacter/>
68. Gryseels S, Amissah D, Durnez L, Vandelannoote K, Leirs H, De Jonckheere J, et al. Amoebae as Potential Environmental Hosts for *Mycobacterium ulcerans* and Other Mycobacteria, but Doubtful Actors in Buruli Ulcer Epidemiology. Small PLC, editor. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012 Aug 7;6(8).

- 69.** Cateau E, Delafont V, Hechard Y, Rodier MH. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*. 2014 Jul;87(3):131–40.
- 70.** Clark NC, Ørjan Olsvik, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC. Detection of a Streptomycin/Spectinomycin Adenylyltransferase Gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1999 Jan 1;43(1):157–60.
- 71.** Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011 Aug;29(7):524–34.
- 72.** Hu L, Chang X, Ye Y, Wang Z, Shao YB, Shi W, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011 Mar 1;37(3):230–4.
- 73.** Jacob J, Evers S, Bischoff K, Carlier Că, Courvalin P. Characterization of the *sat4* gene encoding a streptothricin acetyltransferase in *Campylobacter coli* BE/G4. *FEMS microbiology letters*. 1994 Jul 1;120(1-2):13–7.

9. ANEXOS

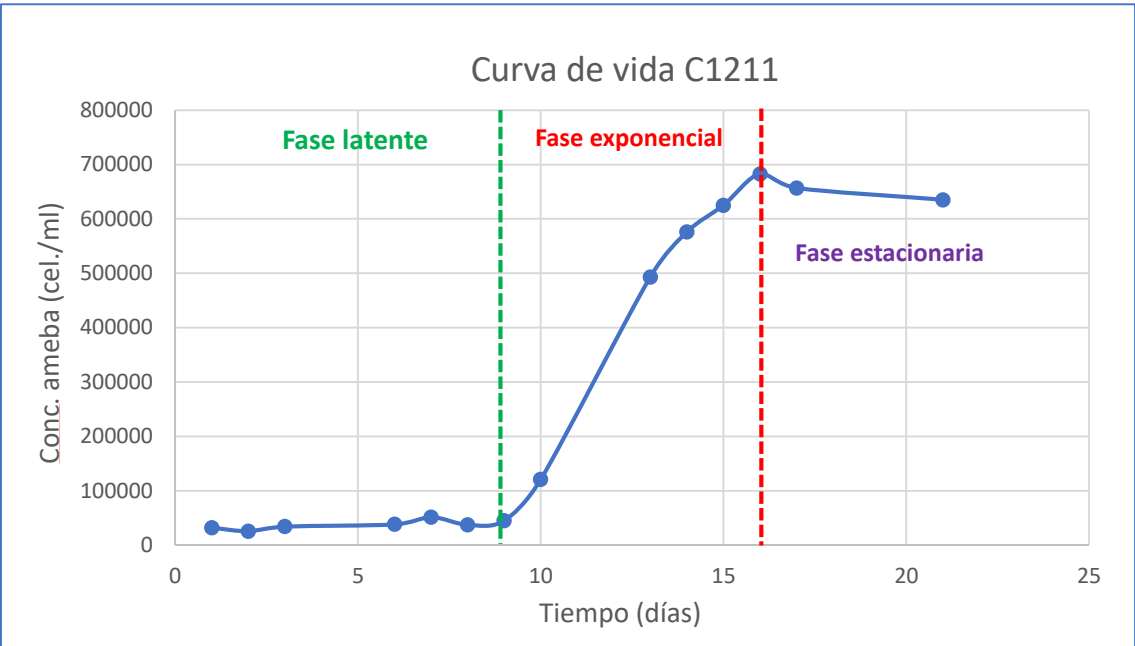


Figura S1: Curva de vida de la cepa C1211.

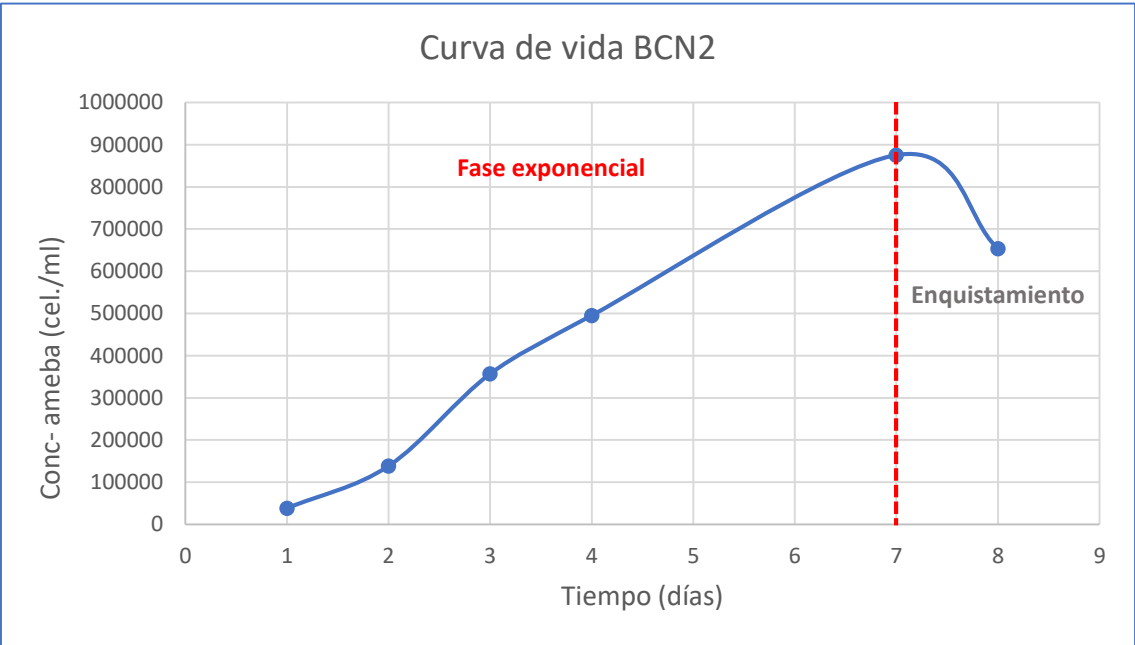


Figura S2: Curva de vida de la cepa BCN2.

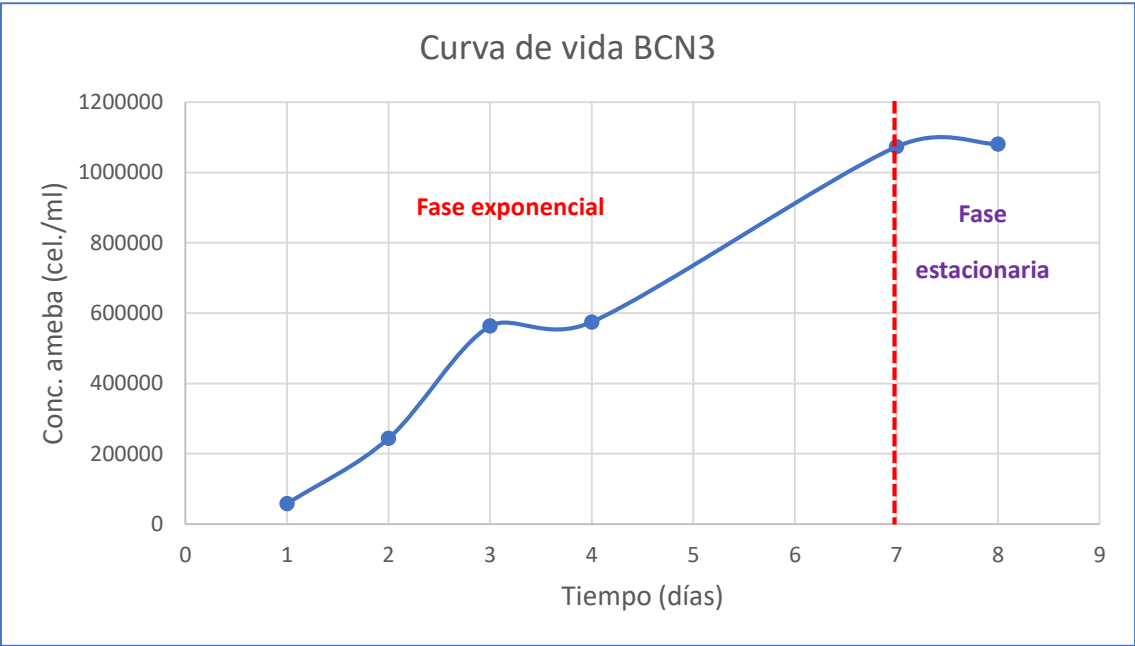


Figura S3: Curva de vida de la cepa BCN3.

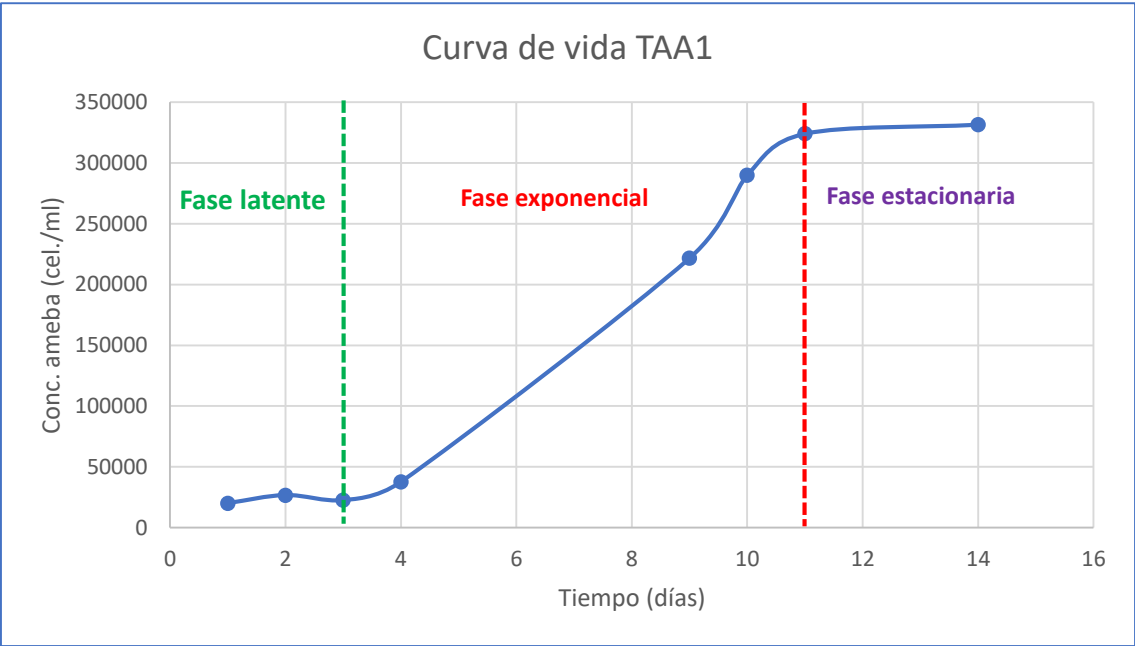


Figura S4: Curva de vida de la cepa TAA1.

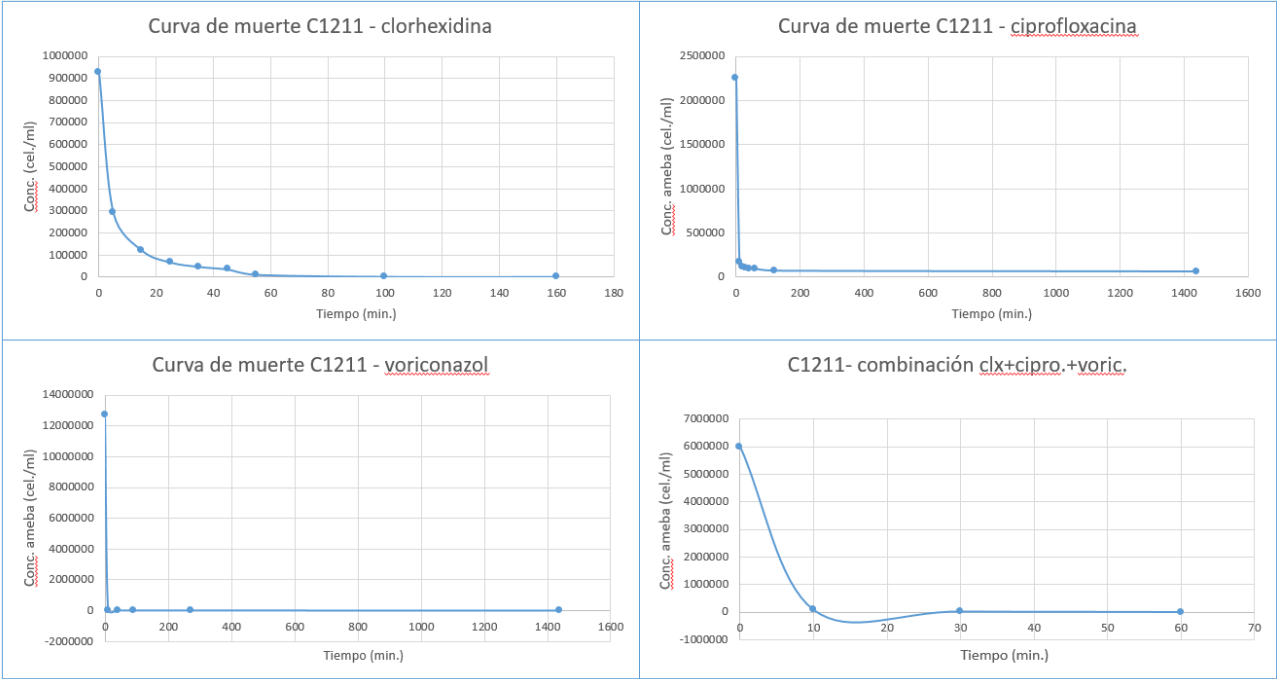


Figura S5: curvas de muerte para la cepa C1211.

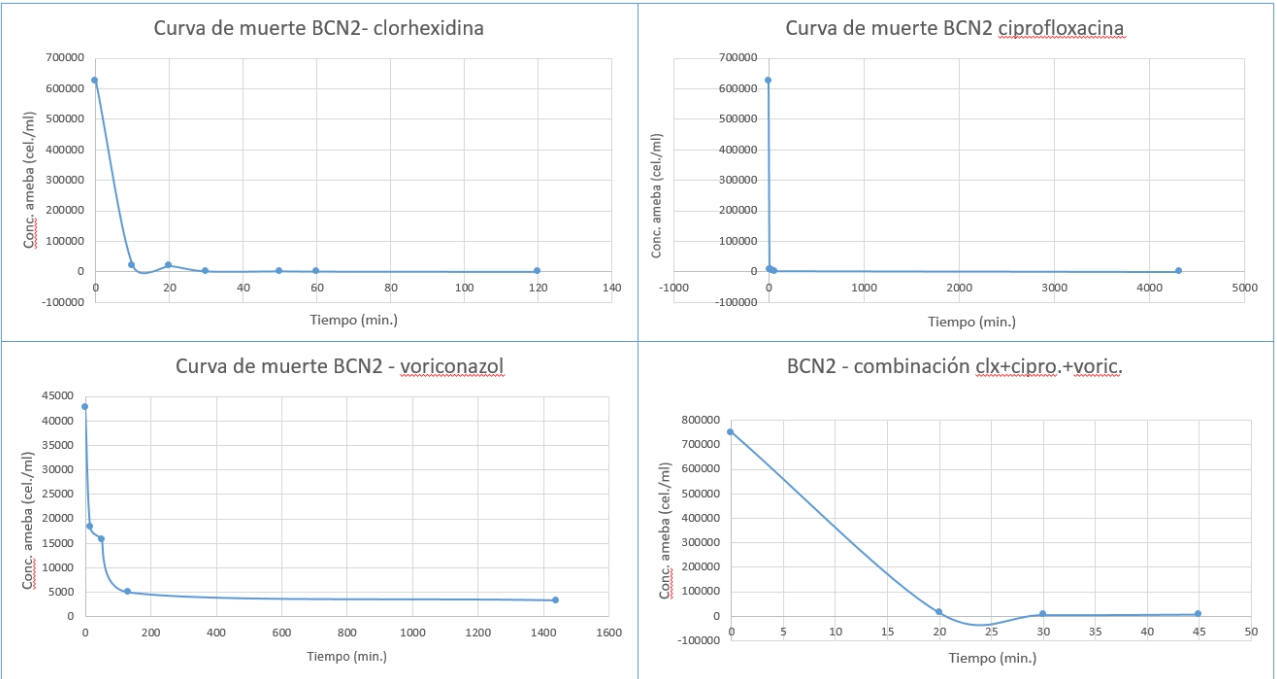


Figura S6: curvas de muerte para la cepa BCN2.

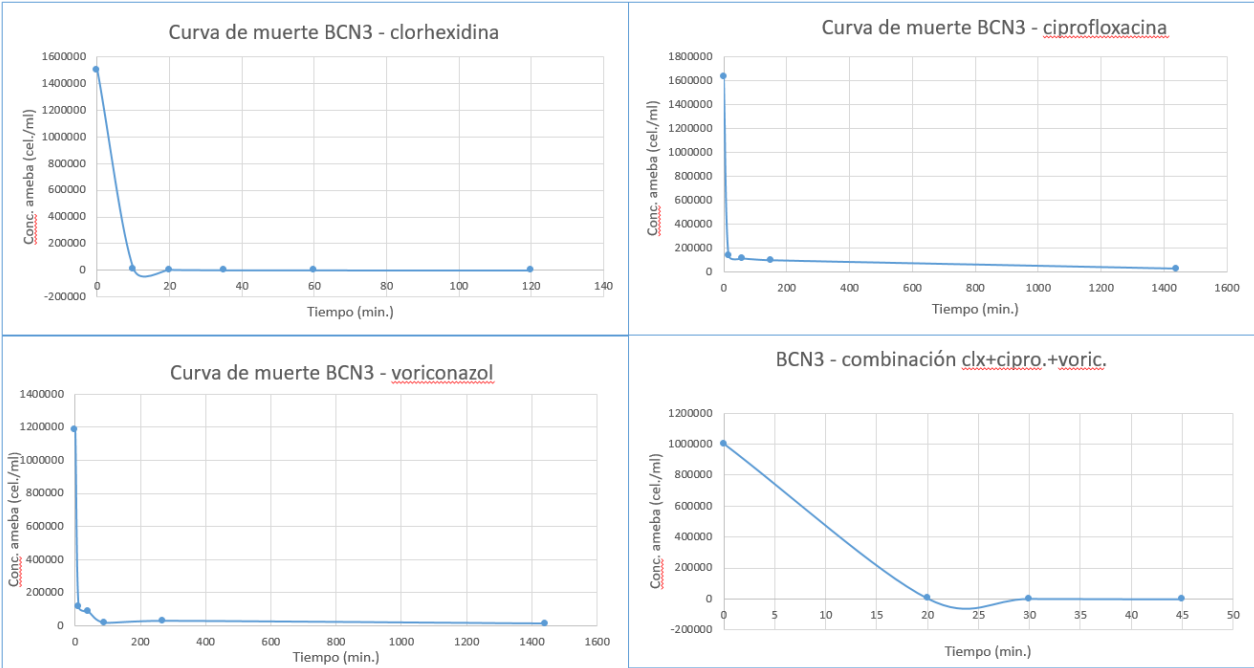


Figura S7: curvas de muerte para la cepa BCN3.

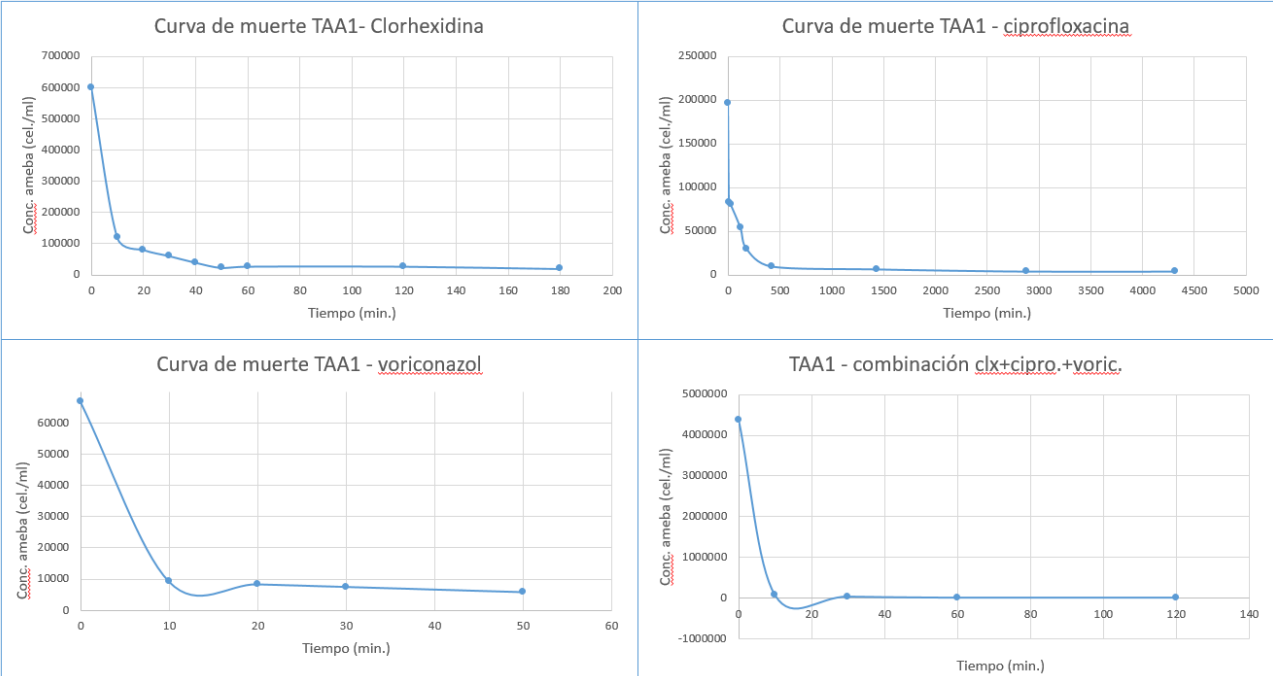


Figura S8: curvas de muerte para la cepa TAA1.

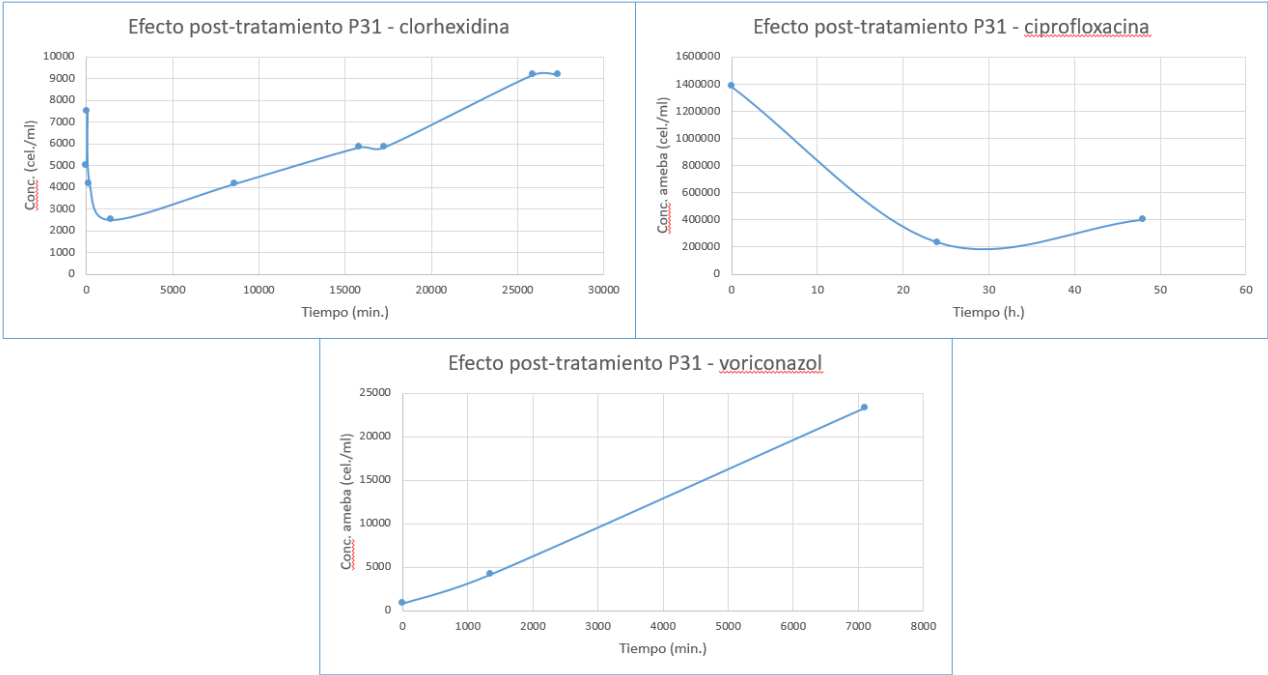


Figura S9: curvas de efecto post-tratamiento de la cepa P31.

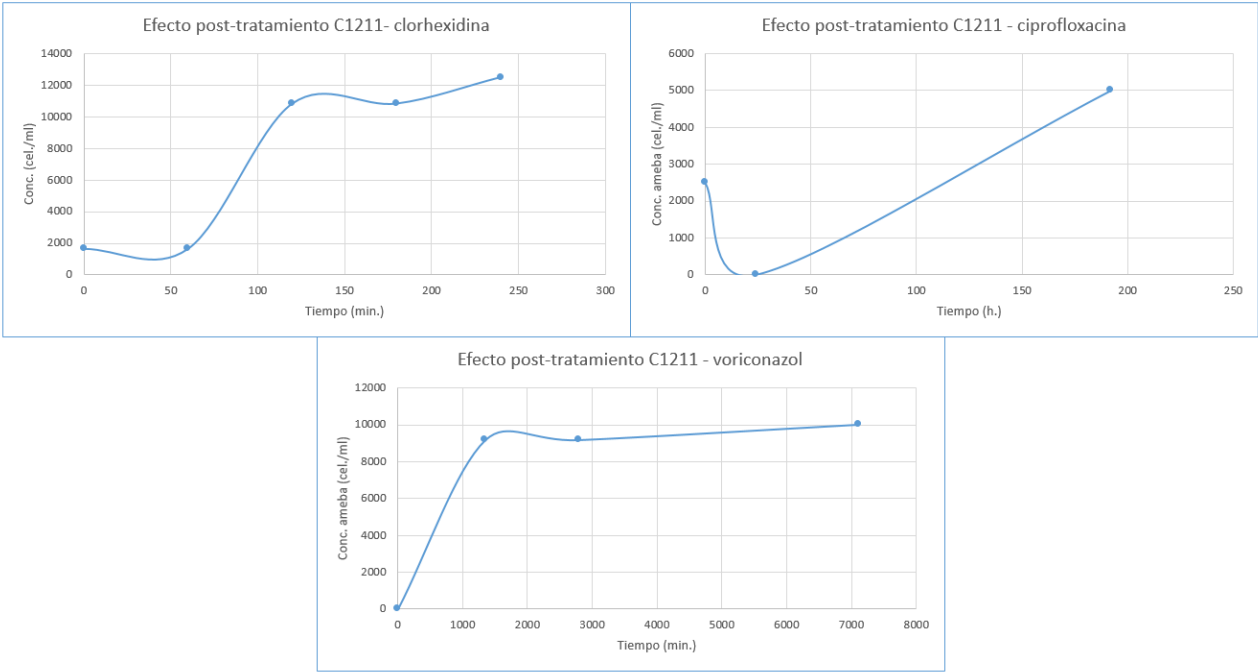


Figura S10: curvas de efecto post-tratamiento de la cepa C1211.

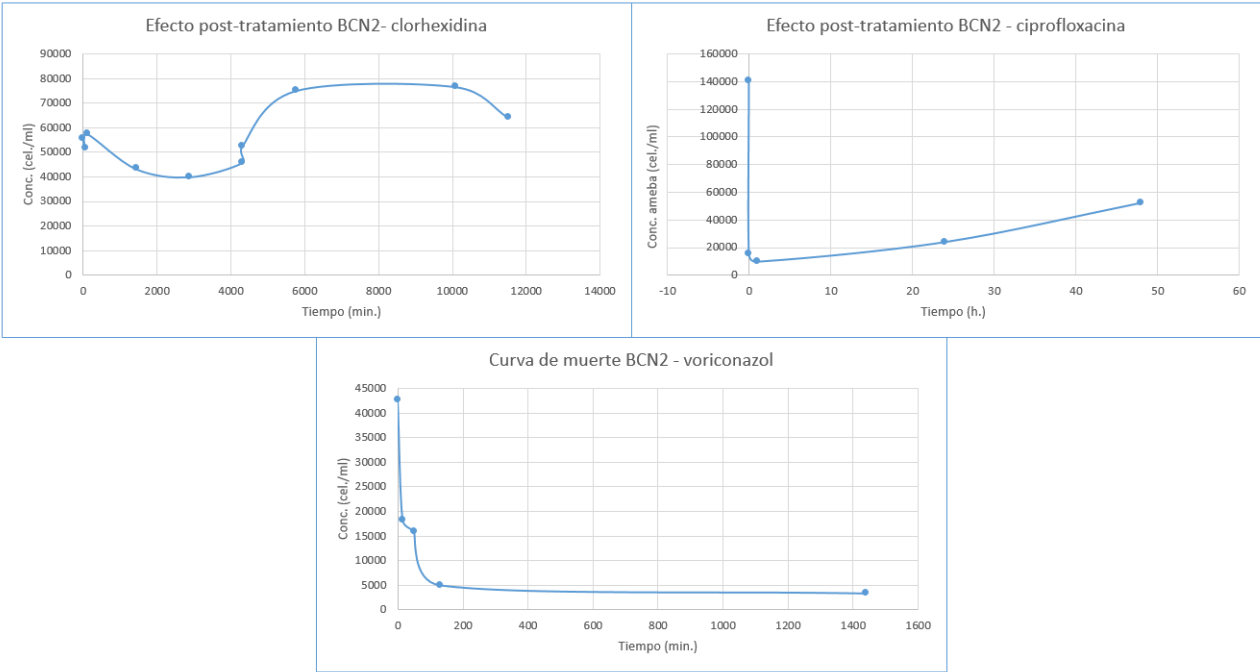


Figura S11: curvas de efecto post-tratamiento de la cepa BNC2.

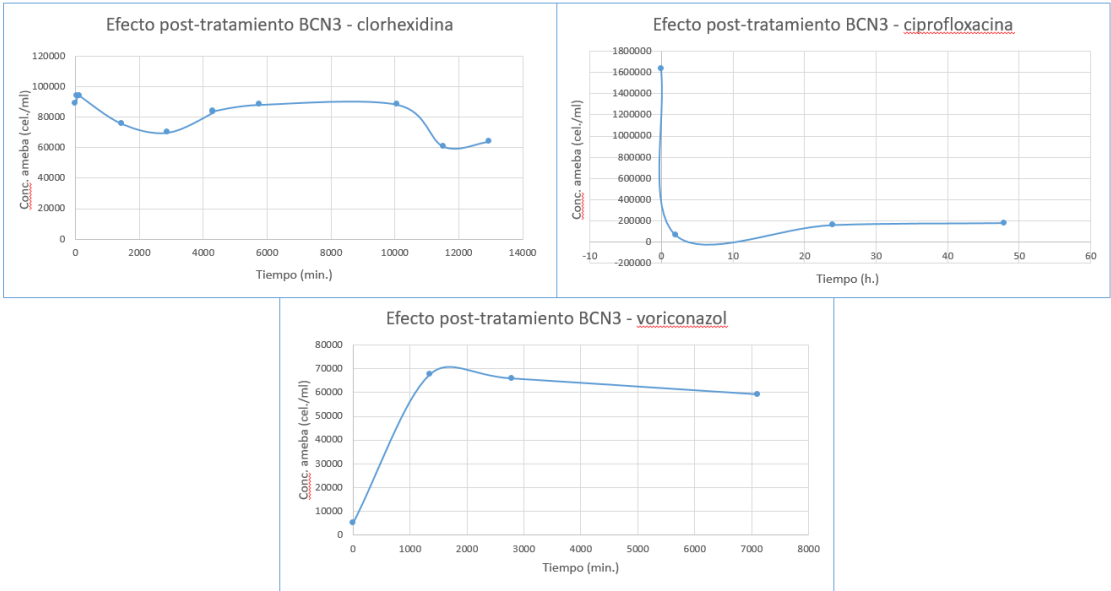


Figura S12: curvas de efecto post-tratamiento de la cepa BCN3.

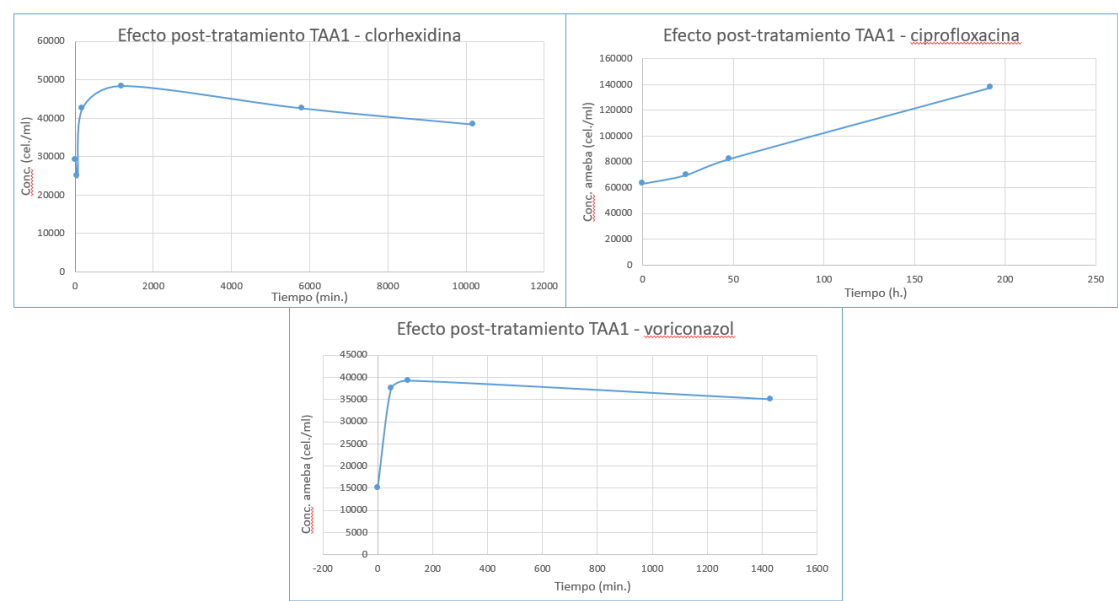


Figura S13: curvas de efecto post-tratamiento de la cepa TAA1.

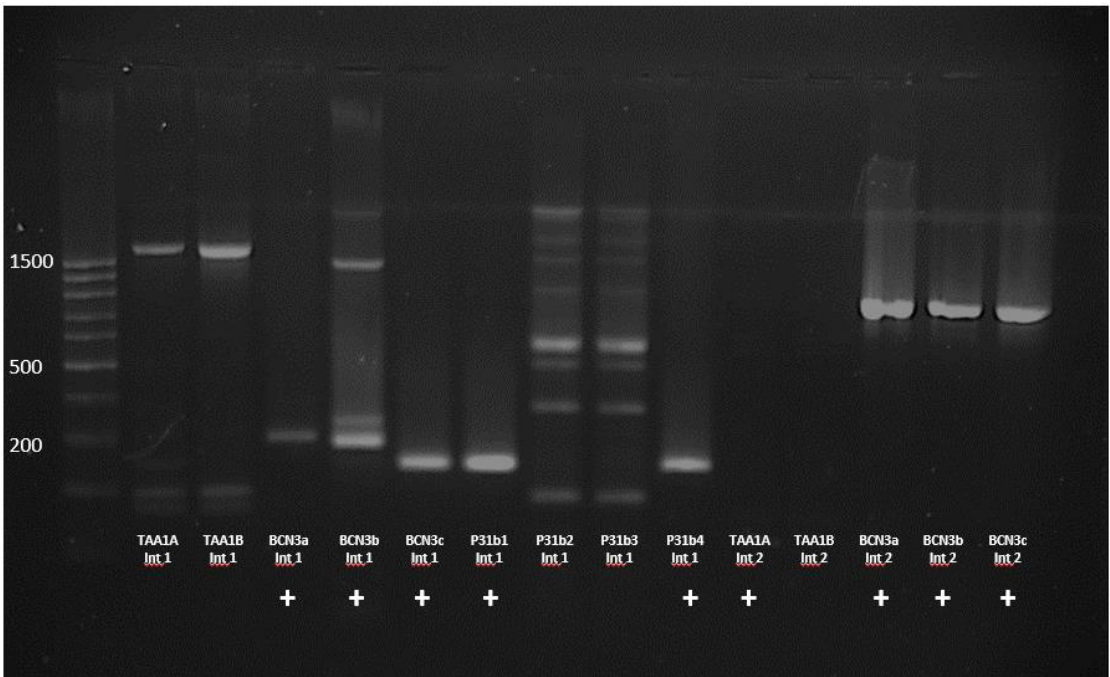


Figura S14: Resultados para la PCR de identificación de integrones.

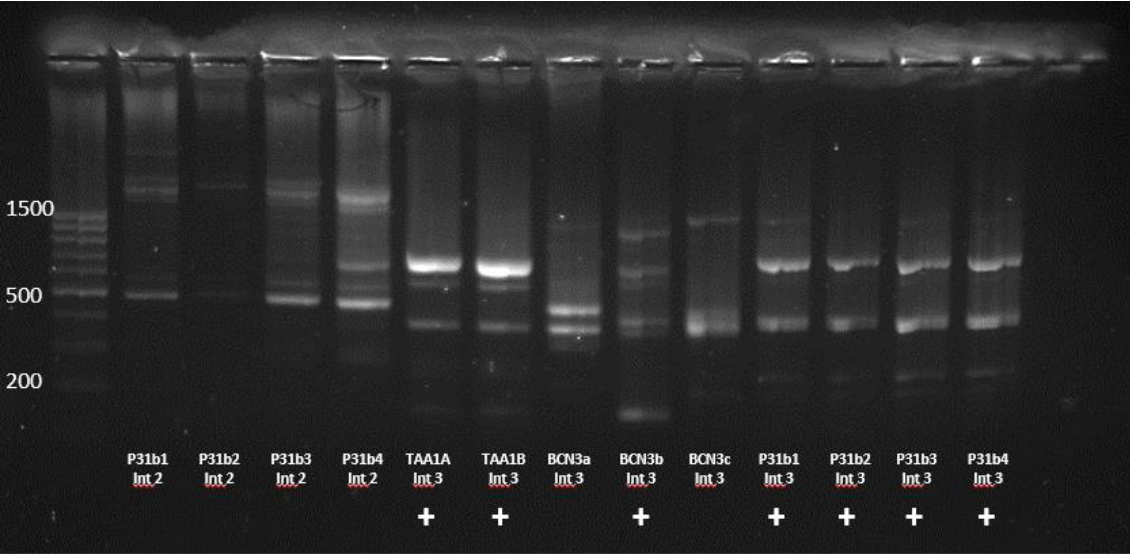


Figura S15: Resultados para la PCR de identificación de integrones.

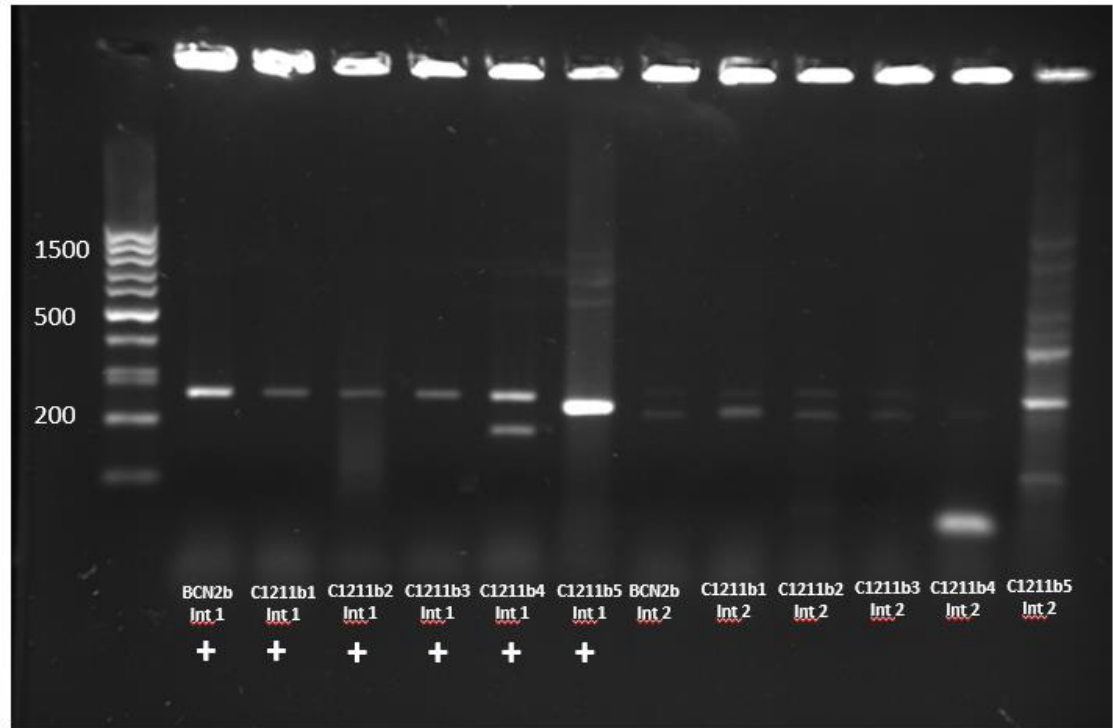


Figura S16: Resultados para la PCR de identificación de integrones.

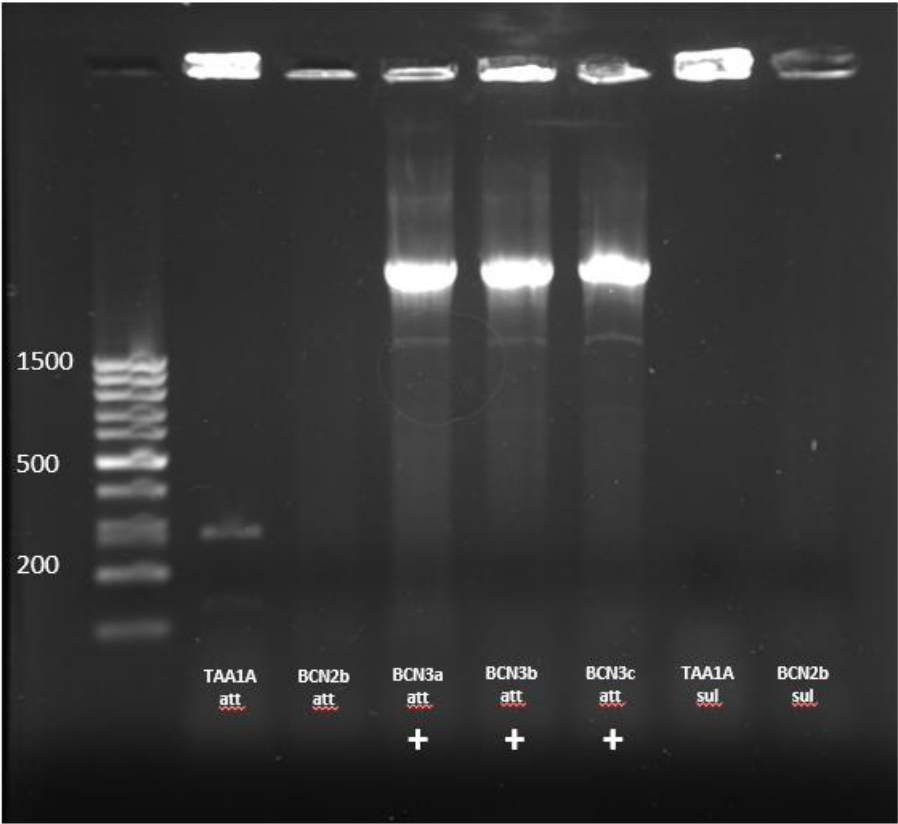


Figura S17: Resultados para la PCR de caracterización de genes de resistencia en integrones.

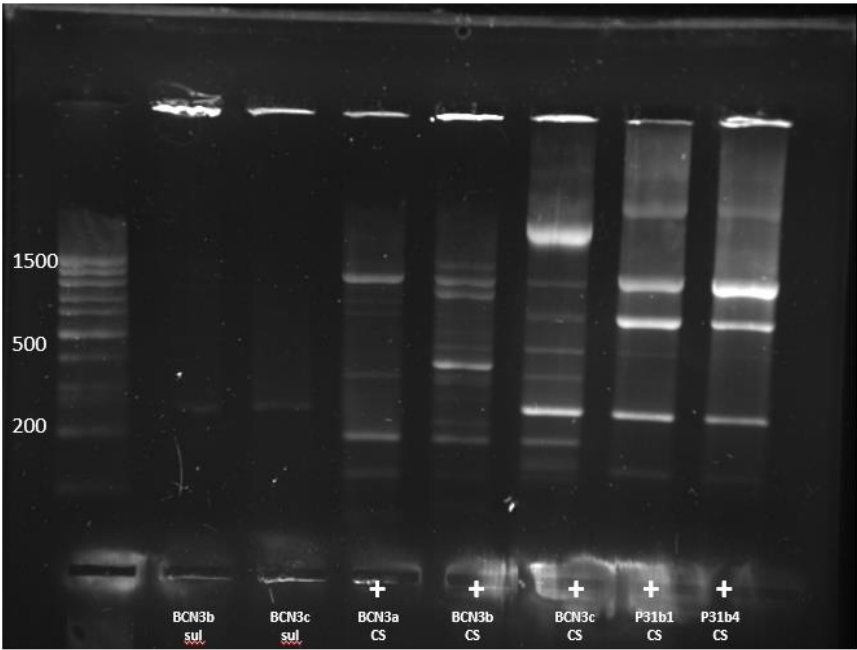


Figura S18: Resultados para la PCR de caracterización de genes de resistencia en integrones.

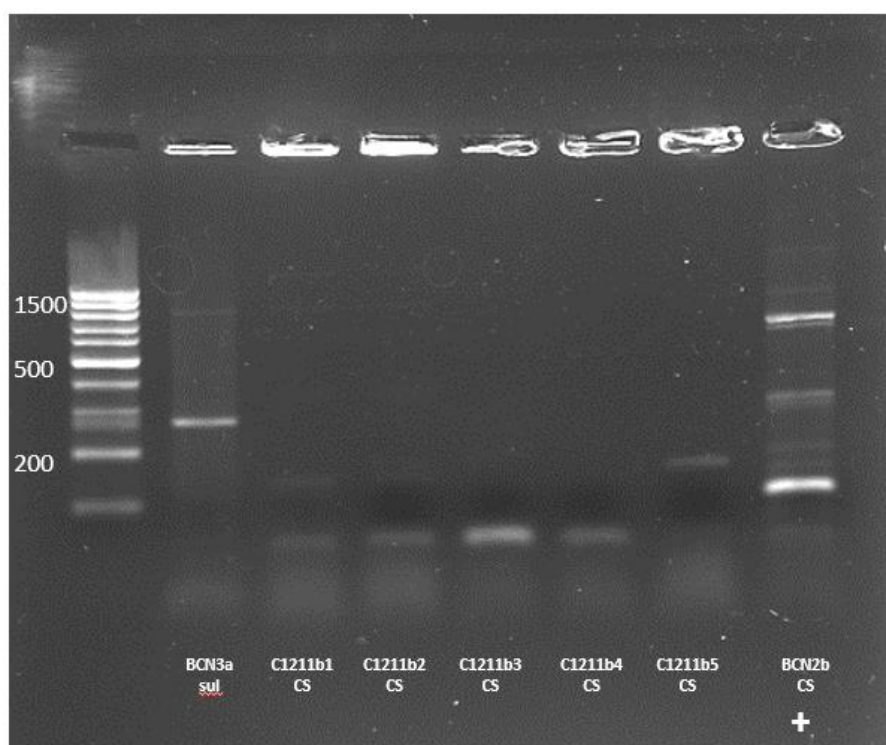


Figura S19: Resultados para la PCR de caracterización de genes de resistencia en integrones.