

Resistencia de quistes de *Acanthamoeba* spp. a la exposición prolongada a bajas temperaturas

Resistance of *Acanthamoeba* spp. cysts to prolonged exposure to cold temperatures

Tomassini Loriana¹, Randazzo Viviana R.^{2*}

RESUMEN: Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* son protozoos ubicuos y anfizoicos de amplia distribución en la naturaleza. Han sido aislados tanto en ambientes naturales acuáticos y terrestres como en hábitats humanos. Presentan dos biotipos: trofozoítos, formas tróficas y reproductivas; y quistes o estadios de resistencia. Son patógenos oportunistas para el ser humano pudiendo ocasionar cuadros graves de elevada morbimortalidad. Asimismo, pueden actuar de reservorio de microorganismos de importancia en salud pública. *Acanthamoeba* spp. permanece viable a temperaturas comprendidas entre 25 °C y 35 °C, pero existe escasa información respecto de lo que ocurre a bajas temperaturas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la supervivencia de diferentes cepas de *Acanthamoeba* spp. frente a incubaciones continuas a temperaturas de congelación a -5 °C y de freezer a -20 °C. Se utilizaron 3 cepas de *Acanthamoeba* spp: *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, *Acanthamoeba* spp. aislada en una sala cerrada de un hospital pediátrico, y *Acanthamoeba* spp. recuperada de un humedal costero del sudeste bonaerense. Las cepas fueron sometidas a tratamientos de congelación a -5 °C y -20 °C por 30, 120 y 270 días. Se realizaron controles de crecimiento y viabilidad de quistes post exposición e identificaciones morfológicas en fresco, subcultivos y coloraciones especiales. Los resultados revelaron que el 100% de las cepas de *Acanthamoeba* spp. utilizadas en este estudio se mantuvieron viables por 30, 120 y 270 días tanto a -5 °C como a -20 °C, evidenciando la resistencia de los quistes del protozoario a la congelación. Dado que *Acanthamoeba* spp. no solo pueden actuar como reservorios de microorganismos de importancia sanitaria, sino que además pueden actuar como patógenos oportunistas, los resultados obtenidos poseen implicancias relevantes en el ámbito de la microbiología ambiental, la salud pública y la vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas.

Palabras clave: amebas de vida libre, protozoos, resistencia, congelación

ABSTRACT: Free-living amoebas of the genus *Acanthamoeba* are ubiquitous, amphizoic protozoans widely distributed in nature. They have been isolated from both aquatic and terrestrial natural environments and from human habitats. They present two biotypes: trophozoites, trophic and reproductive forms; and cysts, or resistant stages. They are opportunistic pathogens in humans, being able to cause severe conditions with high morbidity and mortality. They can also act as reservoirs for microorganisms of public health importance. *Acanthamoeba* spp. remains viable at temperatures between 25 °C and 35 °C, but little information exists regarding their viability at low temperatures. The objective of this study was to determine the survival rate of different strains of *Acanthamoeba* spp. under continuous incubation at freezing temperatures of -5 °C and freezer temperatures of -20 °C. Three strains of *Acanthamoeba* spp were used: *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, *Acanthamoeba* spp. isolated in a closed ward of a pediatric hospital, and *Acanthamoeba* spp. recovered from a coastal wetland in southeastern Buenos Aires. The strains were subjected to congelation (-5 °C) and freezing (-20 °C) for 30, 120 and 270 days. Growth and viability controls of cysts post exposure were performed, as well as morphological identifications in fresh, subcultures and special stainings. The results revealed that 100% of the *Acanthamoeba* spp. strains used in this study remained viable for 30, 120 and 270 days at both -5 °C and -20 °C, evidencing the resistance of the protozoan cysts to freezing. Since *Acanthamoeba* spp. can not only act as reservoirs for microorganisms of health importance but can also act as opportunistic pathogens, the results obtained have significant implications for environmental microbiology, public health, and epidemiological surveillance of infectious diseases.

Keywords: free-living amoebas, protozoa, resistance, freezing

¹ Cátedra de Parasitología Humana, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Deán Funes 3350 – CP7600, Mar del Plata, Buenos Aires. Argentina.

² Cátedra de Microbiología y Parasitología, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Sur. San Juan 670 – CP 8000, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: viviana.randazzo@uns.edu.ar - ARK CAICYT: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s23139862/0c2v4pfsc>

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos ubicuos y anfizoicos, ampliamente distribuidos tanto en la naturaleza como en hábitats humanos (Schuster y Visvesvara, 2004; Khan, 2006). Se han aislado en suelo, en humedales costeros y continentales, en aguas residuales, piscinas, sistemas de ventilación, equipos de diálisis y odontológicos, lentes de contacto y productos oftálmicos y en tejidos de animales y seres humanos, donde pueden actuar como parásitos facultativos. Existen cuatro géneros de AVL potencialmente patógenos para el humano: *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* y *Acanthamoeba*; siendo este último el género más abundante en la naturaleza (Schuster y Visvesvara, 2004; Khan, 2006).

Acanthamoeba spp. es responsable de diversas enfermedades en humanos, como la queratitis amebiana, la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), además de infecciones cutáneas, nasofaríngeas, pulmonares y renales, que afectan principalmente a individuos con sistemas inmunológicos debilitados (Schuster y Visvesvara, 2004; Król-Turmińska y Olender, 2017). *Acanthamoeba* spp. no solo es un organismo oportunista, sino también puede actuar como reservorio de diferentes microorganismos, algunos de los cuales pueden ser patógenos humanos, estableciendo con ellos relaciones endosimbióticas (Schuster y Visvesvara, 2004). La interacción entre el protozoo y sus endosimbiontes resulta de interés al momento de desarrollar nuevas estrategias de control y tratamiento.

En Argentina, *Acanthamoeba* spp. ha sido reportada en piscinas de uso recreativo, en agua de consumo para animales, en salas cerradas de hospital, en agua de mar, y como causante de casos de queratitis amebiana (Gertiser et al., 2010; Costamagna, 2018; Tomassini et al., 2022; Tomassini et al., 2024).

Los estadios evolutivos del género *Acanthamoeba* son dos: un estadio vegetativo y de división llamado trofozoíto, y un estadio de resistencia denominado quiste. El trofozoíto suele ser uninucleado y posee finos pseudópodos (acantópodos), que otorgan a la ameba movilidad lenta y pausada. En condiciones óptimas de crecimiento el trofozoíto se divide por fisión binaria. Cuando los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. sufren alguna condición de estrés (Lloyd, 2014) experimentan un proceso de diferenciación celular denominado enquistamiento que da como resultado la formación de quistes, estadios que otorgan mayor resistencia a condiciones ambientales *in vitro* (Lloyd, 2014; Masangkay y Masangkay, 2023). El proceso de enquistamiento en *Acanthamoeba* spp. ocurre de manera sincrónica y en tres fases secuenciales con distinto tiempo de duración: la etapa de inducción que dura entre 4 y 6 horas, seguida de la etapa de síntesis de la pared, que dura de 20 a 24 horas, y finalmente

una etapa latente con actividad metabólica reducida que ocurre de 2 a 7 días posteriores a la etapa de síntesis de pared.

Los quistes de *Acanthamoeba* spp. tienen doble pared: una capa externa o exoquiste, y una capa interna o endoquiste. La doble pared actúa como barrera física frente a medicamentos y químicos dirigidos contra la ameba, proporcionándole resistencia a condiciones extremas como alteraciones en la osmolaridad, pH, desecación, bajas temperaturas o agentes químicos antimicrobianos (Brown y Cursons, 1977; Rivera-Posada y Villalobos, 2012; Gabriel y Panaligan, 2020; Masangkay y Masangkay, 2023). Si bien los estudios indican que *Acanthamoeba* spp. crece y permanece viable por largos periodos de tiempo a temperaturas medias comprendidas entre 25 °C y 35 °C (Schuster y Visvesvara, 2004; Khan, 2006; Dos Santos et al., 2024), existe escasa información respecto de lo que ocurre a bajas temperaturas cuando el protozoo es expuesto de manera continua e ininterrumpida a refrigeración o congelación.

El estudio de la resistencia de los quistes de *Acanthamoeba* spp. frente al frío tiene implicancias tanto para el control ambiental como para la salud pública (Król-Turmińska y Olender, 2017). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la supervivencia de diferentes cepas de *Acanthamoeba* spp. frente a incubaciones prolongadas a temperaturas de congelación -5 °C y de freezer a -20 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las experiencias se desarrollaron en gabinete de trabajo para cultivos microbiológicos que cuenta con cabina de bioseguridad dotada de luz ultravioleta (UV).

Cepas de *Acanthamoeba*

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron tres cepas de *Acanthamoeba* spp: una cepa de *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461 (A), una cepa de *Acanthamoeba* spp. aislada en hábitats humanos (sala cerrada de un hospital pediátrico ubicado en la provincia de Buenos Aires) (Tomassini et al., 2022) (B), y una cepa ambiental de *Acanthamoeba* spp. recuperada de un humedal costero del sudeste bonaerense (Partido de General Pueyrredón) (Tomassini et al., 2024) (C).

Preparación de los inóculos

Para desarrollar la experiencia se sembraron seis placas de agar no nutritivo (ANN) Britania con 100 µl de suspensión de la cepa A (A1, A2, A3, A4, A5 y A6), seis placas de ANN con 100 µl de suspensión de la cepa B (B1, B2, B3, B4, B5 y B6) y seis placas de ANN con 100 µl de suspensión de la cepa C (C1, C2, C3, C4, C5 y C6). A cada una de las placas se les adicionó 500 µl de Solución de Page con cepas de *Escherichia*

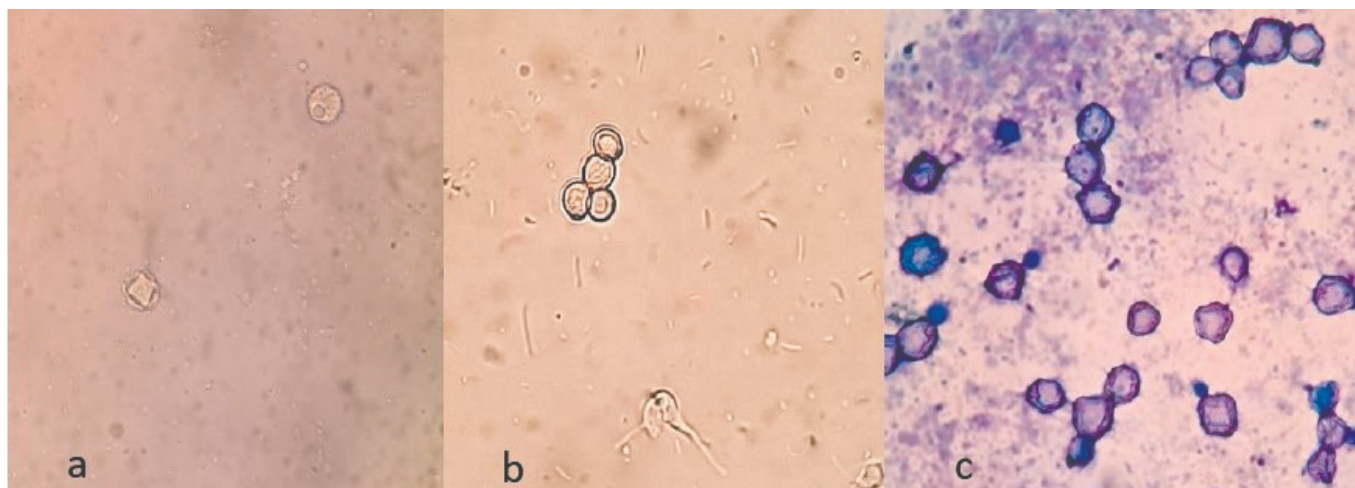


Figura 1. *Acanthamoeba* spp. cepa B (aislada en hábitats humanos) post exposición a -5°C durante 270 días. a, b) Quistes y trofozoítos en fresco, sin colorear, en el MO a 400 aumentos. c) Quistes coloreados con Ziehl-Neelsen en el MO a 400 aumentos.

coli ATCC 25922 en fase exponencial de crecimiento. A continuación, y con la finalidad de obtener crecimiento confluyente de las cepas, se incubaron todas las placas en estufa a temperatura constante y controlada de 37°C (termómetro calibrado Hanna) durante seis días. Al sexto día las placas fueron retiradas de la estufa y observadas directamente en un microscopio Leica DM500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), certificando el crecimiento de las amebas. A continuación, las placas A1, A2, A3; B1, B2, B3; C1, C2 y C3 fueron almacenadas en un congelador a -5°C (Gosh Modelo R16) mientras que el resto de las placas (A4, A5, A6; B4, B5, B6; C4, C5 y C6) fueron colocadas en un freezer a -20°C (ScientTemp Modelo 49 9.4).

Tiempos de exposición

Se realizaron controles de crecimiento y viabilidad de quistes a los 30, 120 y 270 días post incubación tanto para las cepas expuestas a congelación (-5°C) como a las cepas conservadas a -20°C .

Detección de viabilidad

Luego de 30 días de exposición a temperaturas de frío se extrajo una placa de cada cepa por cada temperatura de exposición: A1, B1 y C1 correspondieron a temperatura de congelación (-5°C) y A4, B4 y C4 a temperatura de freezer (-20°C). Con el fin de eliminar la formación de cristales de hielo, todas las placas fueron descongeladas 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación, fueron reactivadas con $500\ \mu\text{l}$ de Solución de Page con *Escherichia coli* ATCC 25922 en estufa de cultivo de 37°C durante seis días. Transcurrido el tiempo de incubación y con el fin de controlar el crecimiento amebiano y detectar presencia y viabilidad de quistes, se realizaron observaciones directas de las placas, observaciones microscópicas en fresco (100X y 400X), repiques (subcultivos), y

coloraciones de Ziehl-Neelsen, Tinta China y Giemsa (1000X).

Transcurridos 120 días de exposición a temperaturas de frío (-5 y -2°C), las placas A2, B2 y C2 y A5, B5 y C5 fueron procesadas siguiendo el protocolo utilizado a los 30 días (descrito anteriormente). Asimismo, el protocolo se repitió a los 270 días de exposición para las placas A3, B3 y C3 y A6, B6 y C6. Con el fin de detectar presencia y viabilidad de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp, las placas fueron descongeladas, reactivadas y procesadas, realizándose observaciones microscópicas en fresco (100X y 400X), repiques (subcultivos) y coloraciones especiales (1000X).

Los resultados fueron recopilados en planillas Excel. Los quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. se identificaron y clasificaron morfológicamente empleando un microscopio Leica DM500® (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Las fotografías se tomaron con una cámara Leica ICC50 HD® (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

RESULTADOS

Los resultados revelaron que a -5°C , el 100% de las cepas de *Acanthamoeba* spp. utilizadas en este estudio se mantuvieron viables luego de 30, 120 y 270 días, evidenciando la resistencia de los quistes del protozoario a la congelación, incluso sin el uso de crioprotectores. Los repiques y subcultivos de las cepas de *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, de *Acanthamoeba* spp. hospitalaria y de *Acanthamoeba* spp. ambiental expuestas de manera continua e ininterrumpida a temperaturas de congelación (-5°C) durante 30, 120 y 270 días, evidenciaron la presencia de trofozoítos y quistes ornamentados y lisos en todas las placas procesadas, sin diferencias significativas entre los tiempos evaluados (Fig. 1).

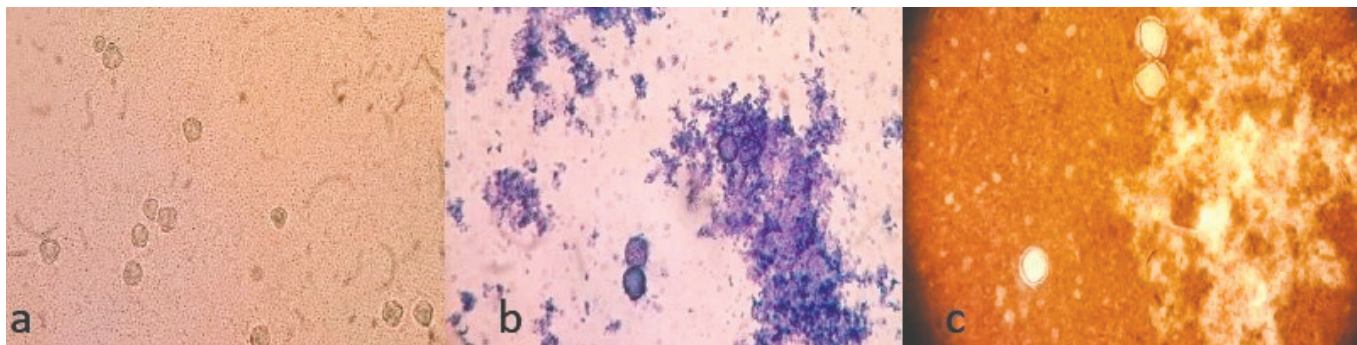


Figura 2. *Acanthamoeba* spp. cepa C (aislada en humedal costero) post exposición a -20°C durante 270 días. a) Quistes en fresco, sin colorear, en el MO a 400 aumentos. b) Quistes coloreados con Ziehl-Neelsen en el MO a 400 aumentos. c) Quistes coloreados con Tinta China en el MO a 400 aumentos.

Respecto a la exposición continua e ininterrumpida a temperaturas de congelación en freezer, las cepas de *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, *Acanthamoeba* spp. hospitalaria y *Acanthamoeba* spp. ambiental estudiadas, se mantuvieron viables cuando fueron expuestas durante 30, 120 y 270 días, poniendo de manifiesto la supervivencia y adaptabilidad de los quistes del protozoario. La eliminación de cristales de hielo en las placas expuestas a -20°C , la descongelación a temperatura ambiente y la posterior reactivación y repique en agar no nutritivo permitieron la recuperación del protozoo, evidenciándose formas quísticas viables coloreadas posteriormente con Giemsa, Ziehl-Neelsen y Tinta China (Fig. 2).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la notable resistencia de los quistes de *Acanthamoeba* spp. aislados de hábitats humanos y naturales a temperaturas de congelación moderada (-5°C) y de freezer doméstico (-20°C), incluso tras una exposición prolongada de hasta 270 días. Este hallazgo confirma la capacidad de supervivencia de la forma quística ante condiciones ambientales extremas, lo que coincide con reportes previos sobre la elevada tolerancia de *Acanthamoeba* spp. (Rivera-Posada y Villalobos, 2012).

La resistencia observada a temperaturas bajo cero tiene implicancias relevantes en el ámbito de la microbiología ambiental, la salud pública y la medicina. A diferencia de los trofozoítos, que son susceptibles al daño por cristales de hielo, los quistes poseen una doble pared celular y un metabolismo extremadamente reducido, lo que les permite mantener su viabilidad a pesar de la congelación. Esta característica representa un obstáculo para los procesos convencionales de desinfección y conservación, ya que sistemas comunes de refrigeración, incluidos los utilizados para almacenamiento de agua, alimentos o soluciones oftálmicas, no resultan efectivos para eliminar completamente estos organismos.

Estudios previos han documentado la persistencia de quistes de *Acanthamoeba* durante semanas a temperaturas de congelación (-20°C), aunque con una reducción potencial de su capacidad de excitación (Brown y Cursons, 1977; Matoba et al., 1989; Mazur et al., 1995). Asimismo, Mazur y colaboradores demostraron que los quistes de *Acanthamoeba* conservados a 4°C permanecen viables manteniendo su capacidad invasiva durante más de 24 años. Sin embargo, el presente estudio amplía significativamente estos datos al demostrar supervivencia hasta por 270 días, lo que resalta la necesidad de revisar protocolos estándar de almacenamiento, criopreservación y descontaminación. La resistencia al frío de quistes de *Acanthamoeba* plantea un riesgo potencial en entornos clínicos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, donde la presencia inadvertida de quistes en superficies, materiales o soluciones médicas puede favorecer infecciones oportunistas como queratitis amebiana o encefalitis granulomatosa. En este sentido, los protocolos de esterilización utilizados en unidades de cuidados intensivos, quirófanos o laboratorios deben considerar estrategias adicionales que garanticen la inactivación completa de estos organismos.

Asimismo, desde una perspectiva ambiental, la capacidad de *Acanthamoeba* para sobrevivir en fuentes de agua fría o congelada, incluyendo reservorios naturales y sistemas de distribución de agua potable, plantea desafíos en términos de vigilancia epidemiológica. La inclusión de este protozoo como marcador biológico en estudios de calidad del agua y su capacidad endosimbiótica podrían resultar útiles para evaluar la eficacia de los procesos de potabilización, especialmente en regiones con climas fríos o almacenamiento prolongado de agua en condiciones subóptimas.

Finalmente, los hallazgos del presente estudio sugieren la necesidad de desarrollar y validar técnicas alternativas de inactivación que pudieran aplicarse en contextos donde la congelación no ofrece garantías suficientes de descontaminación, resultando

fundamental la incorporación de métodos que logren la inactivación completa y evalúen el impacto de otros factores ambientales sobre la viabilidad y patogenicidad de *Acanthamoeba* spp.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Proyecto PGI 24/B342 SECyT, Universidad Nacional del Sur: "Aportes al conocimiento de zoonosis y econosis parasitarias de importancia en salud pública". Directora: Viviana Randazzo.

LITERATURA CITADA

- Brown, T. J. y Cursons, R. T. (1977). Effects of low temperatures on pathogenic free-living amoebae in axenic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(2), 241-245.
- Costamagna, S. R. (2018). Breve reseña sobre infecciones humanas por amebas de vida libre en Argentina. *Revista Argentina de Parasitología*, 7, 7-16.
- Dos Santos, D. L., Chaúque, B. J. M., Matiazio, F. F. y Silva, M. T. (2024). Agar dehydration: A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* spp. collection at room temperature. *Parasitology Research*, 123(1), 153. <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08172-7>
- Gabriel, A. A. y Panaligan, D. C. (2020). Heat and chlorine resistance of a soil *Acanthamoeba* sp. cysts in water. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 453-464. <https://doi.org/10.1111/jam.14600>
- Gertiser, M. L. (2015). Aspectos biológicos y epidemiológicos de amebas de vida libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Sur, Argentina. <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2567>
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), 564-95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>
- Król-Turmińska, K. y Olender, A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2), 254-260.
- Lloyd, D. (2014). Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. *Experimental Parasitology*, 145(Suppl), S20-S27. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.026>
- Masangkay, F. R. y Masangkay, R. F. (2023). First report on the long-term viability of *Acanthamoeba* species in unpreserved environmental freshwater samples stored at room temperature. *Journal of Water and Health*, 22(11), 2194-2204. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.199>
- Matoba, A. Y., Pare, P. D., Le, T. D. y Osato, M. S. (1989). The effects of freezing and antibiotics on the viability of *Acanthamoeba* cysts. *Archives of Ophthalmology*, 107(3), 439-440.
- Mazur T., Hadas E. y Iwanicka, I. (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence

of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical Medicine and Parasitology*; 46(2):106-8.

- Rivera-Posada, J. A. y Villalobos, G. (2012). Supervivencia de *Acanthamoeba* spp. en condiciones ambientales extremas. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 223-231.
- Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9), 1001-1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>
- Tomassini, L., Costamagna, S. R. y Randazzo, V. R. (2022). Aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en salas cerradas de un hospital en provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 56(4), 521-526.
- Tomassini, L., Domínguez, M. S., Esquius, K. S. y Randazzo, V. R. (2024). Primer aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en agua de mar del sudeste bonaerense, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 56, 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.006>

Recibido: 10 de junio de 2025

Aceptado: 25 de julio de 2025
