

## Aislamiento de *Filamoeba nolandi* (Page, 1967) en una piscina de Sevilla (España)

ARIZA-ASTOLFI, C.; GUEVARA-BENÍTEZ, D.C.; ÚBEDA-ONTIVEROS, J.M.; CUTILLAS-BARRIOS, C.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla (España).

### Summary

The presence of limax amoebae in a swimming pool of Sevilla (Spain) has been studied; one specie has been isolated and designed as 2SE87 strain. For the specific identification, morphologic and genetic studies has been carried out "in vivo" and after staining. Modified Giemsa and Feulgen staining were used for trophozoites studies and PAS for cysts. 2SE87 strain was identified as *Filamoeba nolandi*; we have not found in our literature any report about the presence of such amoebae in our country.

**Key Words:** limax amoebae, swimming pool, *Filamoeba nolandi*.

### Resumen

Se estudia la presencia de amebas limax en una piscina descubierta localizada en la ciudad de Sevilla (España), lográndose el aislamiento de una especie asignada como cepa 2SE87. Para la identificación específica, se realizaron estudios morfológicos y genéticos tanto "in vivo" como "tras tinción". Las tinciones usadas fueron: Giemsa modificado y Feulgen para estudios sobre trofozoítos, y para quistes tinción del PAS. La cepa 2SE87 fue identificada como *Filamoeba nolandi*, no habiéndose encontrado en la bibliografía consultada ninguna cita sobre la presencia de esta ameba en nuestro país.

**Palabras Clave:** amebas limax, piscina, *Filamoeba nolandi*.

### Introducción

En la mayoría de los países que han tomado conciencia del problema que supone para el hombre la existencia de amebas "limax" en las aguas dulces, se han iniciado o intensificado los trabajos sobre aislamiento e identificación de amebas de vida libre para tratar de determinar los lugares donde la presencia de especies patógenas es más probable.

Es por ello, que hemos querido contribuir a aumentar este conocimiento, pero centrándonos, en este caso, en el estudio de amebas "limax" en distintos biotopos de agua dulce localizados en la provincia

piscina cubierta, lago, pozo, ríos, manantial y agua mineral envasada; las nueve localizaciones resultaron ser positivas a la presencia de estas amebas, siendo las especies encontradas las siguientes: *Naegleria gruberi*, *Echinamoeba exundans*, *Filamoeba nolandi*, *Acanthamoeba mauritaniensis*, *Hartmannella vermiformis*, *H. cantabrigiensis*, *Platyamoeba placida*, *Vannella platypodia*, *V. simplex*, *V. mira* y *V. miroides*.

Las piscinas son una de las principales fuentes de contaminación amebiana para el hombre, debido a las temperaturas alcanzadas en las mismas por el efecto de la radiación solar, así como el acúmulo de

y falta de limpieza adecuada (Derr-Harf y col.<sup>2</sup>, Madrigal-Sesma y col.<sup>4</sup>). Además, la cloración, difícil de controlar en piscinas abiertas por la continua agitación, no solo no disminuye la población amebiana (Derrreux y col.<sup>1</sup>), sino que su desarrollo aumenta al eliminarse otros protozoos sensibles al cloro que podrían competir nutricionalmente con ellas (Jadin<sup>3</sup>).

En el presente trabajo se describe la especie *Filamoeba nolandii*, aislada de una piscina descubierta, no habiéndose encontrado en la bibliografía consultada ninguna cita sobre la presencia de esta especie en nuestro país.

### Material y Métodos

La muestra fue tomada, durante el mes de Septiembre, de una piscina descubierta, reservada para niños. El volumen tomado fue de un litro, sometándose dicha muestra al proceso habitual de filtración y aislamiento en placas de agar al 2% adicionada de cloruro sódico al 0,005% e incubadas a 28, 37 y 42°C (Page<sup>5</sup>). En las placas positivas se procedió al aislamiento por dilución en placas de microtiter, bajo microscopio invertido. Posteriormente, se inocularon en placas Petri conteniendo ANN y ANNE. Para la identificación de las especies se realizaron estudios morfológicos y genéticos, tanto "in vivo" como "tras tinción". Las tinciones usadas fueron: Giemsa modificado y Feulgen para estudios sobre los trofozoitos, y para quistes tinción del PAS.

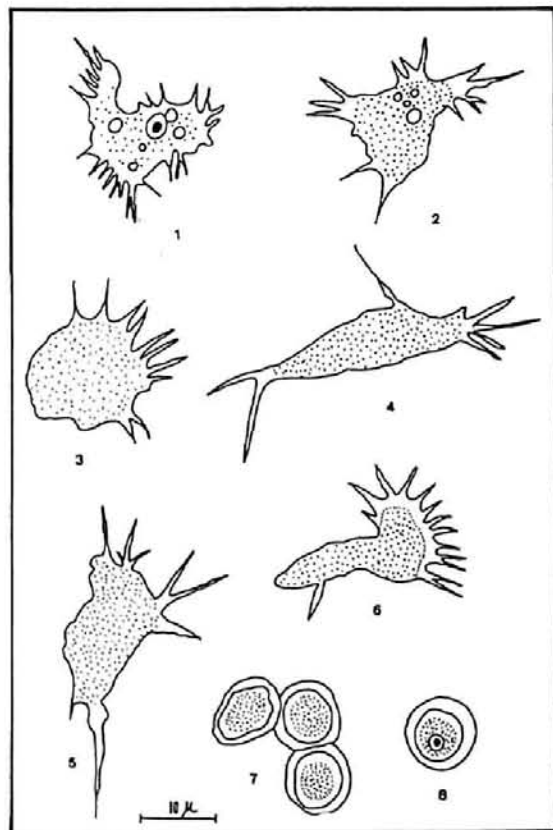
### Resultados

Una de las características más relevantes de esta especie fue la gran diversidad de formas en que se presenta, así como su espectacularidad, debido al gran número de pseudópodos filosos que sur-

Se observó que cuando el trofozoito no estaba en plena actividad de locomoción, forma inactiva, se presentaban formas aplanadas y ensanchadas, siendo multipolares; es decir, los pseudópodos filosos se encontraban localizados a lo largo de todo el contorno del trofozoito, solo o en grupos de varios (Esquema 1.1 y 1.2) (Lámina 1.1).

Las formas bipolares, donde los filópodos aparecían en la parte anterolateral y posterior de la ameba, solo se observaron cuando existía movimiento de traslación de dicha ameba, apareciendo el resto del contorno liso (Esquema 1.3 a 1.6).

El movimiento pseudopodial no es eruptivo, sino suave, lento, acompañado



Esquema N.º 1: Trofozoitos y quistes de *Filamoeba nolandii* "in vivo".

1 a 6.- Distintos aspectos del trofozoito en locomoción.

lo presentó unos valores de 2-3 micras.

Es de destacar el elevado número de vacuolas pulsátiles, que se encuentran repartidas por toda la región endoplásmica, no teniendo tendencia a emigrar para su estallido hacia el polo posterior, tal y como ocurre en la mayoría de las especies de amebas limax. El número medio encontrado fue de 7, pero se llegaron a contar hasta 15 en una misma ameba. El diámetro máximo fue de 5 micras, pero el tamaño era muy variable (Lámina 1.1).

Las vacuolas alimenticias estaban presentes en número variable y su tamaño era casi igual al del núcleo.

Las formas flotantes fueron observadas tras inundación de la placa y posterior agitación. Estas formas son muy fugaces. Suelen tener aspecto redondeado y con un número y longitud variable de filópodos (Lámina 1.2). El diámetro de esta forma flotante, no incluyendo los filópodos, fue de  $11,3 \pm 1,9$  micras; siendo los valores extremos 7 y 15 micras.

Test de flagelación negativo.

### Quistes:

El enquistamiento en placa se produjo tras dos días de la siembra en agar fresco. Los quistes presentan un contorno liso, suelen ser esféricos si se encuentran aislados (Esquema 1.8). Bajo microscopio invertido se observan con un tono amarillo verdoso. Están provistos de dos capas. El tamaño medido sobre 100 formas quísticas fue de  $9 \pm 1,6$  micras, con unos valores extremos entre 7 y 14 micras.

El desenquistamiento en placa se produjo a las 12 horas de la resiembra en agar fresco.

La pared quística dio positiva la prueba del PAS, no existiendo diferencias entre la capa externa y la interna.

### Estudios aenéticos:

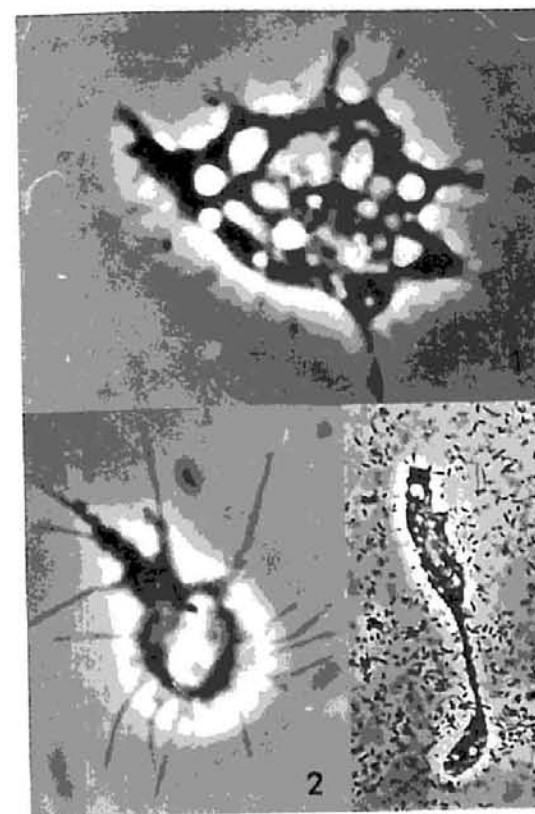


Lámina N.º 1: Trofozoitos y quistes de *Filamoeba nolandii* "in vivo".  
1.- Forma multipolar; 2.- Forma flotante; 3.- Citocinesis.

de un ensanchamiento del extremo anterior para su cambio de dirección. Es de destacar la gran adherencia que presentaban los trofozoitos sobre el agar.

El tamaño determinado en 100 trofozoitos dio unos valores de longitud de  $17,2 \pm 3,2$  micras y de anchura de  $10,2 \pm 2,1$  micras, con unos valores extremos de 11 y 25 micras de largo y 7 y 17 micras de ancho. Hay que hacer notar que los valores máximos se corresponden siempre con las formas bipolares. La relación longitud/anchura fue de  $2,3 \pm 4,9$ .

El núcleo, altamente deformable, se localiza por lo general en la zona central del endoplasma, estando sus valores com-

1976<sup>8</sup>, la división nuclear fue del tipo mesomitosis con desaparición temprana de membrana nuclear. Fue muy característico la observación "in vivo" de la citocinesis, ésta comienza con formación de una constricción desapareciendo la hebra citoplasmática que conecta entre las dos células hijas aproximadamente diez minutos más tarde (Lámina 1.3).

#### Condiciones de cultivo:

Tanto su aislamiento, como su cultivo se realizó por siembra sobre placas de agar no nutritivo al 2%, adicionado de cloruro sódico al 0,005% e incubadas a 28°C.

La cepa ha sido designada como 2SE87 y se encuentra depositada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla.

#### Discusión

La cepa 2SE87, aislada de la muestra procedente de una piscina pública reservada para niños, se incluyó dentro de la familia *Echinamoebidae* Page, 1975 por coincidir con las características de la misma.

La inclusión de la cepa 2SE87 en el género *Filamoeba* Page, 1967 se ha realizado en base a la presencia de finos y largos pseudópodos, a veces ramificados pero no anastomosados, que emergen de una zona citoplasmática hialina, división por mesomitosis con desaparición de nucleolo y membrana nuclear, por la ausencia de pseudópodos en forma espinosa (género *Echinamoeba*), por ausencia de formas limax típicas y de nucleolos periféricos (género *Stachyamoeba*) (Page, 1975<sup>7</sup>).

La diferenciación específica no ofreció problema alguno, dado que la única especie incluida dentro de este género y des-

talmente con los datos observados en la cepa aislada por nosotros (Cuadro N° 1).

Con respecto al tamaño de la forma trofozoica, la longitud de nuestra cepa queda dentro de los límites dados en la descripción original, así como el diámetro del núcleo y del nucleolo. El elevado número de vacuolas pulsátiles es también coincidente (cepa original 17, cepa 2SE87 15). Respecto al diámetro de la forma flotante, éste es perfectamente equiparable con el dado para la cepa original. Las formas quísticas también fueron coincidentes tanto en el diámetro quístico como en el diámetro del núcleo del quiste. Finalmente el patrón genético en ambas especies es de tipo mesomitótico con desaparición temprana de membrana nuclear.

Cuadro 1

Datos dados por los distintos autores para la especie *Filamoeba nolandi*

Especies	<i>F. nolandi</i>	2SE87
L	13-48	11-25
A	-	7-17
L/A	-	1,0-3,6
ø N	3,4-5,5	3,5-4
ø n	1,4-3,4	2-3
Vel.	10-21	-
ø max, VP	2,8-4,8	3-5
N.º VP	17 ( $\bar{x}$ =4)	15 ( $\bar{x}$ =7)
Rit.	5	-
ø f.fl.	6,3-15,7 ( $\bar{x}$ =9,4-12,6)	7-15
Q ø max.	8-15 ( $\bar{x}$ =10)	7-14
ø N Q	2,6-4,0 ( $\bar{x}$ =3,3)	2-4
Mit.	Mesomitosis.	Mesomitosis.

L= Longitud; A= Anchura; L/A= Relación longitud/anchura; ø N= Diámetro núcleo; ø n= Diámetro nucleolo; Vel= Velocidad (micras/minuto); ø VP= Diámetro vacuola pulsátil; Rit.= Ritmo de pulsación (segundos). Todas estas medidas sobre el trofozoito. ø f.fl.= Diámetro forma flotante; Q ø max.= Quistes diámetro

Hay que hacer la salvedad de que aunque Page en 1967<sup>6</sup>, citaba el fenómeno de canibalismo para esta especie, nosotros no llegamos a observarlo.

Es por ello que hemos identificado la cepa 2SE87, aislada por nosotros, con la descrita por Page en 1967 como *Filamoeba nolandi*.

#### Referencias

1. Derreumaux, A.L.; Jadin, J.B.; Willaert, E.; Moret, R.— Action du chlore sur les amibes de l'eau. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, 54, 1974, 415-428.
2. Derr-Harf, C.; Molet, B.; Schreiber, J.; Kremer, M.— Epidemiologie des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 53, 1978, 467-477.
3. Jadin, J.B.— De la dispersion et du cycle

des amibes libres. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, 54, 1974, 371-385.

4. Madrigal-Sesma, M.J.; Santillana, I.; Martínez, A.R.— Presencia e identificación de amebas limax en el agua de piscinas de Madrid. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 44, 1984, 379-386.
5. Page, F.C.— Taxonomic criteria for limax amoebae, with description of three new species of *Hartmannella* and three of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 14, 1967, 499-521.
6. Page, F.C.— *Filamoeba nolandi* n. gen., n. sp., a filose amoeba. *Trans. Am. Micr. Soc.*, 86, 1967, 405-411.
7. Page, F.C.— A new family of amoebae with fine pseudopodia. *Zool. J. Linn. Soc.*, 56, 1975, 73-89.
8. Page, F.C.— An illustrated Key to fresh water and soil amoebae. *Freshwater Biol. Ass. Sci. Publ. N.º 34*, 1976, 1-155.

(Recibido el 16 de septiembre de 1987; aceptado el 5 de febrero de 1988).