UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUIMICA

"Aspectos biológicos y epidemiológicos de Amebas de Vida Libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp."

Bioquímica María Laura Gertiser

Director: Dr. Sixto Raúl Costamagna
Co-Director: Dra. Elena Concepción Visciarelli

Bahía Blanca 2015 Argentina

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, cátedra de Parasitología Clínica, durante el período comprendido entre noviembre de 2008 y agosto de 2015, bajo la dirección del Prof. Dr. Sixto Raúl Costamagna y la co-dirección de la Dra. Elena Concepción Visciarelli, ambos de la Universidad Nacional del Sur.

Bahía Blanca, octubre de 2015.

Bioquímica María Laura Gertiser

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el …. /…. /…... , mereciendo la calificación de ..... (……)

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Raúl Costamagna, por su confiaza, acompañamiento, paciencia y apoyo incondicional. Por inciarme en el camino de la investigación.
- A la Dra. Elena Visciarelli, por su dedicación, sus consejos, sus conocimientos y su cariño.
- A la Dra. Viviana Randazzo, por las charlas interminables, por sus consejos, por su amistad.
- A Leandro Lucchi y Norma Basabe, por el trabajo en equipo.
- A los Dres. José Luis Lopez y Hugo Lujan por el asesoramiento en las Técnicas de biología molecular.
- Al Méd. Vet. Oscar Jensen, y el Centro de Investigacion en Zoonosis, Sarmiento Chubut, por los muestreos realizados en su provincia, y por mostrarme “mi luagar en el mundo”.
- A los Dres. Silvia Guaglardio y Daniel Tanzola, por los cursos compartidos y los consejos.
- A la Dra. Andrea Vasconsuelo por su colaboración incondicional.
- A la Cátedra de Microbiología Especial por su colaboración.
- Al Centro Optico Megavision, por las muestras clínicas y su asesoramiento.
- Al Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia por permitirme desarrollar este trabajo con total libertad.
- A la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Sur, por otorgarme la beca que permitió que se realice este trabajo.
- A mis padres, Graciela y Juanjo, por enseñarme que con esfuerzo todo es posible.
- A mi esposo, Emiliano, por la paciencia, el aliento y apoyo inconcional.
- A mi familia y amigos por acompañarme en todo momento.
- A mis colegas, por acompañarme durante todo este tiempo.
- Al jurado, por dedicar su tiempo para evaluar este trabajo.

INDICE **Página**

Resumen 4
Abstract 6
Capítulo 1: Introducción 8
1.1. Ubicación Sistemática 8
1.2 Naegleria sp. 15
1.3 Balamuthia mandrillaris 20
1.4 Acanthamoeba spp. 25
1.5 *Sappinia* sp. 36
1.6. AVL como "*Caballos de Troya*" 39

Capítulo 2: Búsqueda y aislamientos de Amebas de Vida Libre (AVL). 43

2.1 AVL en la naturaleza 43
2.1.1 Ecoepidemiología de AVL en Bahía Blanca. 45
2.1.1.a. Amebas de Vida Libre (AVL) y el agua 48

2.1.2 AVL en otras regiones de la República Argentina 67
2.2. Casos clínicos de Queratitis Amebiana (QA) en Bahía Blanca. 86

2.3 Otras muestras 96
2.3.1. Búsqueda de AVL en soluciones conservadoras de los estuches para lentes de contacto en la ciudad de Sarmiento, Chubut, Argentina. 96
2.3.2 Búsqueda de AVL en muestras biológicas destinadas a análisis bacteriológicos. 105

Capítulo 3: Resistencia de *Acanthamoeba* spp. 109
3.1. Resistencia de *Acanthamoeba* spp., frente a soluciones cloradas. 112
3.2. Eficacia de soluciones comerciales multiuso para lentes de contacto frente a quistes de *Acanthamoeba.* 116
3.3. Resistencia de los quistes de *Acanthamoeba* frente a soluciones de etanol. 120

Capítulo 4: Análisis ultraestructural de aislamientos de *Acanthamoeba* spp 123

Capítulo 5: Presencia de Trehalosa en *Acanthamoeba* spp 148

Capítulo 6: Tipificación molecular de los aislamientos de AVL 154

Capítulo 7: Cepa "No A no N" y partículas virales endosimbiontes 167
7. 1. Cepa No A no N 167
7. 2. Caracterización preliminar de las estructuras citoplasmáticas compatibles con morfología viral 172

Conclusiones generales 180

Productividad del trabajo de tesis 183

Bibliografía 186

RESUMEN

Las Amebas de Vida Libre (AVL) son protozoos anfizoicos de amplia distribución en la naturaleza. Cuatro géneros pertenecientes a este grupo han demostrado ser patógenos para el hombre y animales de experimentación: *Naegleria, Balamuthia, Acanthamoeba y Sappinia.* En particular, a *Acanthamoeba* se la considera una AVL "ubicuista", ya que se la ha hallado en todos los ambientes y lugares donde se la ha investigado.

El objetivo de esta tesis fue la búsqueda, aislamiento e identificación de AVL aguas. Los sitios de muestreo correspondieron a la Ciudad de Bahía Blanca y a otros sitios geográficos de la Republica Argentina. En Bahía Blanca se analizaron muestras de agua corriente y de tanques de reserva domiciliarios, de aguas recreacionales (piscinas cubiertas) y arroyos. Se tomaron muestras del Rio Sauce Grande en la localidad bonaerense de Sierra de la Ventana. Se muestrearon aguas de consumo y recreación de la Localidad de Sarmiento, provincia del Chubut. Se analizaron muestras de diversas fuentes en distintas provincias de la Republica Argentina. En total se procesaron 274 muestras de aguas de diferentes fuentes y localizaciones. Las muestras fueron clasificadas en aguas tratadas (cloradas u otro tratamiento: tanques, grifos, piscinas, etc) y naturales (de ríos, lagos, canales, arroyos, etc.). Dentro de esta clasificación solo el 30% de las aguas tratadas analizadas fueron positivas para el aislamiento de AVL, mientras que dentro de las aguas naturales se obtuvo un 92,6% de positividad en los cultivos. Del total de estos aislamientos, el 98,7% correspondió al género *Acanthamoeba*, tanto por clasificación morfológica como por métodos moleculares; mientras que 1,3% restante correspondió a una cepa que denominamos "No A, no N", sin ubicación genérica determinada y de cuyo análisis ultraestructural se desprendió la existencia de endosimbiontes compatibles con partículas virales. Se analizaron también muestras clínicas procedentes de 4 posibles casos de queratitis amebiana humana, resultando 2 de ellos positivos para AVL, y que correspondieron al género *Acanthamoeba*. Se investigó la presencia de AVL en líquidos comerciales para lentes de contacto, y en diversas muestras biológicas procedentes de un

hospital de Bahía Blanca. En ambos tipos de muestras los aislamientos resultaron negativos.

En todas las cepas aisladas se realizaron análisis morfométricos, ultraestructurales y moleculares, tendientes a caracterizar los aislamientos y confirmar su ubicación genérica. Además se realizaron pruebas de resistencia a diferentes desinfectantes. Nuestros resultados refuerzan la adjetivación de "ubicuista" para las AVL del género *Acanthamoeba*, ya que fueron demostradas en todos la ambientes estudiados. Su amplia distribución, el hallazgo en aguas recreacionales y de consumo y su participación como agentes etiológicos de enfermedad humana, refuerzan la necesidad de implementar medidas de control y prevención, así como su consideración por parte del personal de salud al momento de realizar un diagnostico clínico e instaurar un tratamiento específico.

ABSTRACT

The free-living amoebae (FLA) are amphizoic protozoa widely distributed in nature. Four genera belonging to this group have proved to be pathogenic to humans and experimental animals: *Naegleria, Balamuthia, Acanthamoeba* and *Sappinia*. In particular, *Acanthamoeba* is considered an FLA "ubiquitous" since it has been found in all environments and places where it has been investigated.

The aim of this thesis was the search, isolation and identification of FLA in the waters. Sampling sites were for the city of Bahia Blanca and other geographical sites of Argentina. In Bahia Blanca samples of tap water tanks and household reserves, recreational water (indoor) and streams they were analyzed. Sauce Grande River samples were taken in the locality of Sierra de la Ventana. Drinking water and recreation of the town of Sarmiento, Chubut province were sampled. Samples from different sources in different provinces of Argentina were analyzed. In total 274 samples of water from different sources and locations were processed. The samples were placed in treated water (chlorinated or other treatment tanks, faucets, pools, etc.) and natural (rivers, lakes, canals, streams, etc.). Within this classification, only 30% of treated water tested positive for isolation of FLA, while natural waters within 92.6% positivity in the cultures was obtained. Of all the isolates, 98.7% were *Acanthamoeba*, both morphological classification by molecular methods; while remaining 1.3% corresponded to a strain called "non-A, non-N" without certain generic location and ultrastructural analysis which came off the existence of endosymbionts compatible with viral particles. Clinical samples from 4 possible human cases of amoebic keratitis were also analyzed, resulting in 2 of them positive for AVL, which corresponded to *Acanthamoeba*. FLA's presence in commercial liquid for contact lenses, and various biological samples from a hospital in Bahia Blanca was investigated. In both types of samples were negative isolates.

Morphometric, ultrastructural and molecular, aimed to characterize the isolates and confirm your generic location analyzes were performed on all isolates. Additionally stress tests were conducted at different disinfectants. Our results reinforce the adjectives of

"ubiquitous" for AVL, especially *Acanthamoeba*, as were demonstrated in all the studied environments. Its wide distribution, the finding in recreational waters and drinkig waters, and their participation as etiologic agents of human disease, reinforcing the need to implement prevention and control measures, as well as consideration by health personnel when making a clinical diagnosis and establish specific treatment.

Capítulo1

Introducción

Bajo la denominación de Amebas de Vida Libre (AVL) se agrupan numerosas especies de protozoos ameboides que, como su nombre lo indica, son capaces de cumplir su ciclo de vida en el ambiente, sin la necesidad de infectar a otros organismos. Dentro de las AVL existen géneros que se comportan como amebas anfizoicas, es decir que poseen la capacidad de vivir libremente en la naturaleza y que ocasionalmente pueden actuar como parásitos facultativos del hombre y animales (Page, 1988; Visvesvara y col, 2007).

Existen cuatro géneros de AVL de patogenicidad demostrada para el hombre y los animales: *Acanthamoeba, Balamuthia, Naegleria* y *Sappinia. (Martínez, 1985; De Jonckheere, 1987; Kilvington* y col., *1991a; John, 1993; Visvesvara* y col., *1993; Centeno* y col., *1996; Martínez y Visvesvara, 1997; Khan, 2001; Schuster* y *Visvesvara, 2004; Lorenzo-Morales, 2010).*

1.1. **Ubicación Sistemática:**

En 1980 "*The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists*" publicó una revisión/actualización de la taxonomía de protozoos que es la tradicionalmente usada en todo el mundo. Esta categorización se basa en las características morfológicas y estructurales de los organismos a clasificar (Fig.1.1).

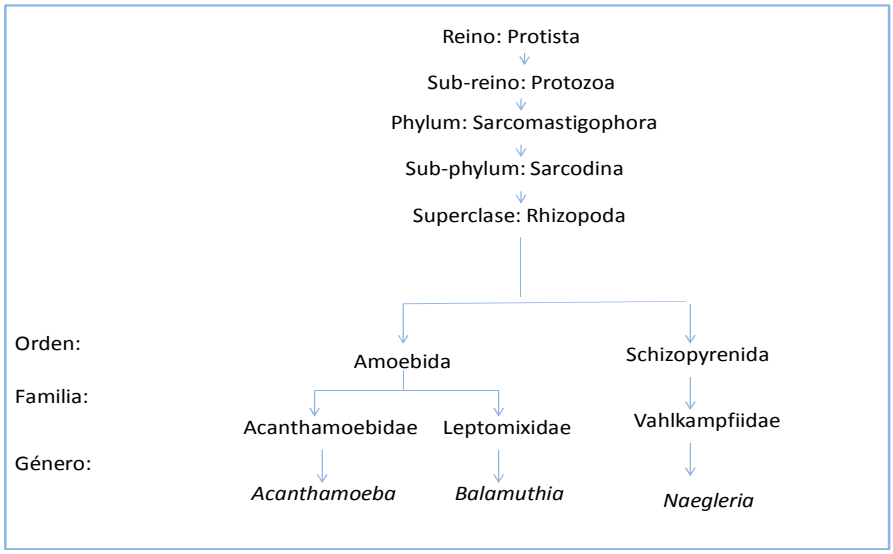


Figura 1.1: Clasificación taxonómica clásica. The Committee on systematics and evolution of the Society of Protozoologysts. A newly revised classification of the Protozoa. 1980. *J Protozool*, 27(1): 37-58.

El término **protozoo** (del Griego *proto*: primero; *zoo*: animal) se emplea para referirse a organismos constituidos por una sola célula, heterótrofos y de forma y tamaño variables. Como características generales estos protozoos son cosmopolitas, han sido aislados de aguas dulces, saladas, de la tierra y de hospedadores vertebrados e invertebrados. Presentan distintos tipos de reproducción: asexual, fisión binaria, múltiple o gemación o sexual por conjugación (Khan, 2006).

Dentro de los ecosistemas pueden actuar como predadores ingiriendo algas, bacterias y levaduras por fagocitosis, lo que requiere interacciones específicas del "alimento" con la membrana plasmática; o por pinocitosis que consiste en la ingestión de líquidos y partículas pequeñas por invaginación de la membrana (Khan, 2009).

El **Phylum Sarcomastigophora** agrupa a los protozoos que poseen flagelos, seudópodos o ambos como forma de locomoción. Tres de los cuatro géneros de AVL que poseen amebas patógenas para el ser humano se ubican en el **Subphylum Sarcodina**, que agrupa a los protozoos con seudópodos como carácter distintivo, aunque en alguna etapa de su ciclo de vida pueden poseer un estadio flagelado.

Las amebas pertenecientes a la **Super-clase Rhizopoda** se caracterizan por presentar: reproducción asexual, enquistamiento común, seudópodos tipo lobópodos, filópodos o reticulopodios.

En el **Orden Amoebida** se ubican aquellos protozoos que pueden presentarse como formas parásitas o de vida libre, sin cubierta protectora, que poseen un solo núcleo y que carecen de etapa flagelada en su ciclo de vida (Martínez Pérez y col., 1985). Dentro de este Orden se ubica la familia Acanthamoiebidae, la que contiene a los géneros *Acanthamoeba* y *Balamuthia*. *Balamuthia* se reubicó en esta familia a partir de la década del 90'; al momento de la publicación citada (Fig.1.1) se encontraba dentro de la Familia Leptpmyxidae (Khan, 2006).

Naegleria pertenece al **Orden Schizopyrenida**, en el cual se ubican protozoos de vida libre que suelen considerarse bifásicos, ya que poseen en su ciclo de vida un estadio flagelado y uno ameboide. Vahlkampfiidae es la familia que contiene a este género de importancia en salud humana.

En la actualidad la "*Internacional Society of Protozoologists*" acepta y recomienda la revisión publicada en el 2005, y revisada en 2012 (Adl y col., 2005; 2012). A diferencia de la revisión anterior, en esta última se basan en estudios morfológicos y ultraestructurales modernos, así como de los últimos avances en estudios moleculares filogenéticos para reordenar a los Eucariotas en "super grupos" (Tabla 1.I).

Tabla 1.I: Clasificación de los Eucariotas. Extraída de "The Revised Classification of Eukaryote" Adl y col., 2012

		Super-groups	Examples
Eukaryota	Amorphea	Amoebozoa	Tubulinea Mycetozoa
		Opisthokonta	Fungi Choanomonada Metazoa
			Apusomonada
			Breviata
		Excavata	Metamonada Malawimonas Discoba
	Diaphoretickes		Cryptophyceae
			Centrohelida
			Telonema
			Haptophyta
		Sar	Cercozoa Foraminifera "Radiolaria"
			Alveolata Stramenopiles
		Archaeplastida	Glaucophyta Rhodophyceae Chloroplastida
	Incertae sedis Eukaryota		Incertae sedis, and table 3

Si bien, de cada uno de estos "super grupos" existe una lista detallada de caracteres, ésta no es clasificatoria, sino que permite destacar características morfológicas comunes de los microorganismos que los componen.

Los cuatro géneros de AVL que han demostrado patogenicidad en humanos se han redistribuido en dos "super grupos": **Amoebozoa** para *Acanthamoeba, Balamuthia* y *Sappinia*; y **Excavata** para *Naegleria* (Fig. 1.2).

Super Grupo **Amoebozoa**	Myxogastria	Centramoebida	*Acanthamoeba*
			Balamuthia
		Thecamoebida	*Sappinia*
Super Grupo **Excavata**	Discoba		*Naegleria*

Figura 1.2: Ubicación taxonómica actual, según Adl *y col.,* 2012

La clasificación taxonómica del género Sappinia, de acuerdo con Wylezich y col., 2015, es la siguiente:

Phylum: Amoebozoa
Subphylum: Lobosa
Clase: Discosea
Subclase: Longamoebia
Orden: Thecamoebida
Familia: Thecamoebidae

En la última actualización en sistemática publicada (Adl y col., 2012), se ubica al género Sappinia dentro del Super grupo Amebozoa (Fig. 1.2) (Gallegos-Neyra y col., 2014)

Un poco de historia:

En 1948 se comunicó el primer caso de infección amebiana. Un soldado japonés de 22 años capturado como prisionero de guerra en 1943 falleció siete semanas después por una infección amebiana diseminada. Inicialmente, la causa de muerte se atribuyó a *Iodamoeba buetschlii*, agente que se clasificó posteriormente cono *Naegleria* para algunos científicos y como *Acanthamoeba* para otros (Derrick, 1948; Martinez y col., 1997; Guitérrez, 2000).

El segundo caso de infección por AVL ocurrió en Tucson, Arizona, EEUU en 1960. Se trató de una niña de 6 años de edad que falleció por un granuloma cerebral inicialmente imputado a *I. buetschlii*, que posteriormente se adjudicó a *Acanthamoeba* spp (Kernoham y col., 1960; Gutiérrez 2000).

En 1969 Symmers realizó el análisis retrospectivo de dos posibles casos de Naegleriosis. Uno correspondía a un joven de Londres fallecido en 1909, en el que los protozoos se observaron en una preparación histológica de museo. El segundo, fue el caso de una niña de 10 años que falleció 10 días después de un accidente en una piscina de natación en 1937 (Symmers, 1969).

El primer caso de meningitis fatal atribuido a *Naegleria* data de 1965, y fue descripto por Fowler y Carter, en Australia (Fowler y col., 1965). En 1966 en EE.UU se registraron 4 casos de meningoencefalitis en los que se observaron elementos parasitarios amebianos, que ulteriormente fueron clasificados por técnicas inmunohistoquímicas como *Naegleria fowleri* (Patras y col., 1966).

En base a las características de los casos descriptos y a la identificación de un estadio ameboflagelado, a la infección causada por *N. fowleri* se la denominó Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP), término acuñado por Butt en 1968 (Patras y col., 1966; Butt, 1966; Butt y col., 1968; Callicott, 1968; Martinez y col., 1997;). Luego de la descripción de la MAP, varios casos fueron diagnosticados en forma retrospectiva en varias partes del mundo:

-Se identificó un brote de 16 casos en Praga, ocurridos entre 1962 y 1965 (Cerva y col., 1968a; 1968b).

-Durante el verano de 1951-1952, ocurrieron 8 casos de meningoencefalitis fulminante en Richmond, Virginia (Callicott y col., 1968).

-El primer caso de infección humana por *Balamuthia mandrillaris* fue documentado en 1991 (Visvesvara y col., 2007) en un paciente con Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA).

1.2 Naegleria sp.

Dentro de este género se describieron alrededor de 47 especies (De Jonckheere, 2004; 2014), sólo una, *Naegleria fowleri*, ha demostrado ser patógena para el humano. *N. australiensis, N. italica y N. philipinensis* son patógenas en animales de experimentación (Cermeño y col., 2006; De Jonckheere, 2014).

Ciclo de vida: Las amebas pertenecientes a este género alternan entre un estadio vegetativo, con formas flageladas y ameboidales y un estadio quístico (Fig. 1.3).

La *forma flagelada*, postulada como el elemento infectante, puede hallarse tanto en ambientes acuáticos como en condiciones de laboratorio por incubación de los trofozoítos ameboides con agua destilada a 37º C (De Jonckheere, 2002; Salomón y col., 2008). En este estado, presenta aspecto piriforme, con 12 a 18 µm de diámetro mayor (Oddó, 2006), y un par de flagelos libres en la parte más angosta lo que le permite "nadar" y desplazarse en el agua (Salomón y col., 2008). Esta forma no tiene la capacidad de dividirse ni alimentarse, en pocas horas revierte espontáneamente al estadio ameboide (Visvesvara y col., 2007).

El *estadio ameboidal* es el encargado de la reproducción, por fisión binaria, e invasión de los tejidos. Posee un tamaño de 15 a 25 µm de diámetro, citoplasma es vacuolado y un núcleo único redondo con un gran nucléolo central refringente. Realiza movimientos por la emisión de seudópodos de citoplasma hialino redondeados, llamados lobópodos, de longitudes y tamaños variables, lo que le da la forma irregular al trofozoíto (Oddó, 2006).

Cuando las condiciones de crecimiento no son las adecuadas se produce el enquistamiento. Sólo la forma ameboidal puede enquistar (Salomón y col., 2008) y este fenómeno ocurre en el ambiente pero no en los tejidos infectados.

Los *quistes* son esféricos de 7 a 12 µm de diámetro. Poseen una doble pared, exoquiste y endoquiste, con poros difíciles de visualizar al microscopio óptico. Si bien son los elementos de resistencia, son muy sensibles a las condiciones de sequía (Schuster y col., 2004; Cermeño y col., 2006; Oddó, 2006; Salomón y col., 2008).

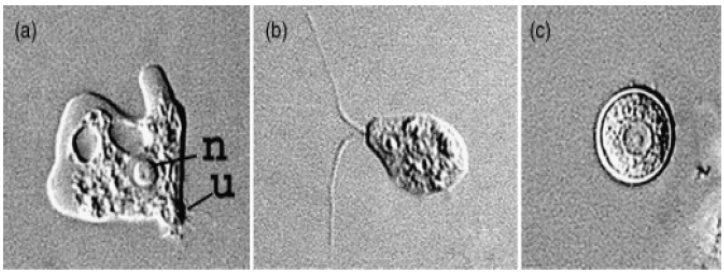


Figura 1.3: Estadios de *Naegleria fowleri*, a: trofozoíto, b: estadio flagelado y c; quiste. Imagen extraída de Visvesvara y col., 2007.

N. fowleri se ha aislado de agua de ríos, lagos y lagunas, especialmente en los meses cálidos. Se hallaron en piscinas, efluentes, bañeras de hidroterapia, canales de irrigación, agua de grifo y también en hisopados nasales de personas saludables. (Schuster, 2002; Visvesvara y col., 2007; Kemble y col., 2012; Cope y col., 2015; Moussa y col., 2015). Las cepas virulentas son termofílicas pudiendo desarrollarse en temperaturas que oscilan entre los 40 y 46 °C (Oddó, 2006). *N. fowlei* prolifera en aguas cálidas cuando la temperatura ambiente supera los 30°C. Esta especie es susceptible a la cloración, medio por el cual puede ser controlada sobre todo es piscinas y aguas de consumo humano, no así en los cuerpos de aguas naturales (Visvesvara y col., 2007).

Patología: La especie patógena de *Naegleria* causa en el hombre y animales un cuadro agudo y fulminante denominado MAP (Oddó, 2006; Cermeño y col., 2006; Salomón y col., 2008). Este es un cuadro de afección meníngea que se presenta en personas inmunocompetentes que tienen contacto con aguas cálidas contaminadas con este protozoo (Martínez, 1985; Kilvington y col., 1991b; Marciano-Cabral y col., 2000). Se da principalmente en niños y hombres jóvenes, ya que son los que realizan inmersiones más enérgicas y con mayor frecuencia, lo que favorece el ingreso de este protozoo a través de las fosas nasales (Visvesvara y col., 2007; De Jonckheere 2014).

Es una enfermedad aguda de curso rápido y fulminante que lleva a la muerte 3 a 10 días después de la aparición de los síntomas. Cuando el individuo se sumerge en aguas contaminadas, aparentemente, la forma flagelar penetra por las fosas nasales y a través del epitelio neuro olfatorio alcanzaría el espacio subaracnoideo donde se trasformaría en la forma ameboidal para comenzar a replicarse e invadir en el SNC. *N. fowleri* prolifera en el tejido cerebral, Líquido Cefalorraquídeo (LCR) y meninges (Oddó, 2006; Cermeño y col., 2006; Visvesvara y col., 2007).

N. fowleri se conoce como "la ameba que devora el cerebro", lo cual hace literalmente por fagocitosis a través de su amebostoma (copas de alimentación o suctores). Además secreta una batería de enzimas: fosfolipasa, proteasas, hemolisinas, perforinas, etc., responsables del efecto citopático de la invasión (Schuste y col*.,* 2004). El periodo de incubación varía de 3 a 7 días, los síntomas son variables pudiendo presentarse cefaleas, fiebre, rigidez en el cuello, fotofobia, diploidía, alteraciones del gusto y olfato, trastornos mentales, coma y muerte. Todos signos de irritación meníngea. El paciente fallece por falla cardiopulmonar y edema pulmonar como consecuencia del aumento de la presión intracraneal con herniación cerebral (Martinez, 1985; Visvesvara y col., 2006). El diagnóstico suele confundirse con el de una meningitis viral, por ello es importante el antecedente del contacto con aguas cálidas en los días previos al inicio de los síntomas (Visvesvara y col., 2007; Gallegos-Neyra y Calderón, 2012; Kemble y col., 2012; Cope y col., 2015).

Diagnóstico: Un análisis exhaustivo del LCR y por personal familiarizado con esta etiología permite un diagnóstico correcto y la posibilidad de una terapia temprana, con lo que se incrementan las posibilidades de sobrevida.

El LCR de una persona infectada presenta las siguientes características: hipertenso, color grisáceo o blanco amarillento, puede estar ligeramente teñido con glóbulos rojos, cuyo número aumenta a medida que progresa la enfermedad. Se observa pleocitosis con predominio de leucocitos polimorfonucleares, de 300 a 26.000 cel/mm^3. El líquido es bacteriológicamente estéril, la glucosa es normal o está ligeramente disminuida con

aumento de proteínas (Martinez, 1985; Visvesvara y col., 2006). La observación del líquido en fresco o centrifugado a baja velocidad sin refrigerar, permite la visualización de trofozoítos móviles (Visvesvara y col., 2007). En caso que no se visualicen los trofozoítos y se sospeche esta etiología, se recomienda realizar el cultivo del material sobre agar no nutritivo (ANN) cubierto con bacterias.

La mayoría de los casos se diagnostican post-mortem, para lo cual se realizan cortes de tejido cerebral que se colorean con Giemsa, Hematoxilina Eosina, Tricrómica, etc., o bien pueden visualizarse los trofozoítos presentes en el tejido por técnicas inmunohistoquímicas o inmunofluorescencia directa. Las amebas se visualizan en grupos o aisladas, redondeadas, con citoplasma vacuolado y un núcleo intensamente teñido. Se observan nidos de amebas rodeados de reacción hemorrágica (Visvesvara y col., 2007). Partes de la biopsia también pueden utilizarse para realizar cultivos en agar (Seidel y col., 1982; Martinez y col., 1997; Schuster y col., 2004; Visvesvara y col., 2006).

No es posible realizar diagnóstico serológico, puesto que la mayoría de los pacientes mueren inmediatamente después de la infección, por lo que el sistema inmune no cuenta con el tiempo necesario para preparar su respuesta (Visvesvara y col., 2007).

Las técnicas de biología molecular son otra herramienta útil para el diagnóstico. Se han desarrollado protocolos de PCR, Nested PCR y Real time PCR exitosos para la identificación especifica de *N. fowleri*, tanto para muestras biológicas como ambientales (Visvesvara y col., 2007, Kao y col., 2013). La principal ventaja de estas técnicas es la rapidez con que se logra la identificación, que oscila entre 2 a 5 horas, dependiendo del tipo de muestra, lo cual es primordial para la implementación inmediata del tratamiento adecuado (Qvarnstrom y col., 2006; Kao y col., 2013).

Tratamiento: sólo es efectivo cuando se logra el diagnóstico en fases muy tempranas de la enfermedad. Habitualmente se usa Anfotericina B en el tratamiento de la MAP, con resultados positivo en varios pacientes. Se administra por vía intratecal o intravenosa. Este antibiótico se puede combinar con Miconazol, Rifampicina o Sulfadiazina. Esta última

también se utiliza en el tratamiento contra *Acanthamoeba.* (Salomón y col., 2008; Visvesvara y col., 2007).

No existe hasta el momento en nuestro país (Argentina) reporte de infecciones humanas por *Naegleria.* Se han reportado casos en Colombia, Cuba, Venezuela y Pakistan, entre otros (Galindo y col., 2013; Sierra-Calzado, 2011; Espinal y col., 2012; Shakoor y col., 2012).

En todo el territorio de EE.UU desde 2001, más de 32 personas resultaron infectadas por *Naegleria fowleri* y sólo en dos casos, registrados en el Norte del país, los infectados lograron sobrevivir. (Kemble y col., 2012; Cope y col., 2015; Canal de Noticias RT (17 sep 2013); disponible en: <http://actualidad.rt.com/ciencias/view/105881-ameba-letal-comecerebros-agua-potable-euu?utm_source=rss&utm_medium=rss&utm_campaign=ciencias>)

El aumento de la temperatura como consecuencia del "Calentamiento global", favorece la aparición de casos de MAP en lugares en los que previamente, por cuestiones climatológicas y ecológicas, no estaban dadas las condiciones para que esta especie prolifere (Cogo y col., 2004).

1.3 Balamuthia mandrillaris

Balamuthia mandrillaris es la única especie dentro del género *Balamuthia* que resulta patógena para el ser humano y los animales.

El primer aislamiento de este género se realizó en 1986 del cerebro de un mandril que murió de encefalitis en el Zoológico de San Diego, en Estados Unidos. El primer caso en humanos se registro en 1991, en un paciente inmunosuprimido (Schuster, 2002; Schuster y col., 2003).

Inicialmente se la clasificó como perteneciente a la familia Leptomyxidae (Fig.1.1). En 1993, cuando se logró la producción de anticuerpos específicos contra esta ameba, se apartó de la familia Leptomyxidae para ser reconocida como un nuevo género y una nueva especie: *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara y col., 2007). Se incluye, junto con *Acanthamoeba* y *Sappinia*, dentro del Super Grupo Amoebozoa (Fig.1.2)

Ciclo de vida:

Alterna entre dos formas: trofozoíto y quiste (Fig. 1.4).

Los trofozoítos son generalmente uninucleados, con un gran nucléolo denso y central, en el cual pueden evidenciarse dos o tres cuerpos nucleares. Ocasionalmente pueden observarse trofozoítos binucleados (Visvesvara y col., 1993; Schuster y col., 2004; Jayasekera y col., 2004; 2005). Estas formas vegetativas miden de 12 a 60 µm, son de forma irregular y se desplazan por la emisión de lamelipodios, proyecciones citoplasmáticas aplanadas (Oddó, 2006).

Los quistes poseen un solo núcleo, son esféricos con un diámetro de 10 a 30 µm. Al microscopio óptico parecen estar formados por dos paredes, una externa ligeramente ondulada y una interna redondeada, sin que se evidencie la presencia de poros. Al microscopio electrónico el quiste está rodeado por tres paredes: exoquiste irregular, endoquiste delgado y un mesoquiste amorfo (Visvesvara y col., 1993; Martinez y col., 2001).

Figura 1.4: a: trofozoíto y b: quiste de *Balamuthia mandrillaris*. Imagen extraída de Visvesvara y col., 2007.

La información sobre la fuente de infección es escasa y no se conoce con certeza cuál es la vía de entrada al organismo (Cuevas y col., 2006; Siddiqui y col., 2015). *Balamuthia* ha sido aislada de la tierra, por lo que la manipulación de la misma o la inhalación de quistes adheridos a sus partículas que son arrastradas por el viento podrían ser una fuente de infección (Schuster y col., 2003; Dunnebacke y col., 2004). La ameba puede ingresar al organismo por cortes en la piel, y de allí por diseminación hematógena llegar hasta el SNC, o bien ingresar a través del epitelio nasal al ser aspirada (Kiderlen y col., 2004; Deetz y col., 2003).

Recientemente se ha asilado de muestras de agua, por lo que ésta también podría actuar como vehículo para su transmisión, pero no existe, hasta el momento, el reporte de casos asociados con actividades acuáticas (Schuster y col., 2000; Baquero y col., 2014; Lares-Jiménez y col., 2014).

Patología:

Balamuthia mandrillaris es la única especie dentro de este género capaz infectar al ser humano ocasionando una Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA), causando necrosis hemorrágica en distintas locaciones del Sistema Nervioso Central (SNC). Esta infección presenta características similares a la infección por *Acanthamoeba*.

Balamuthia puede infectar tanto a pacientes inmunodeprimidos, como a individuos inmunocompetentes, entre ellos especialmente a niños y adultos mayores, afectando también a una amplia variedad de mamíferos (Rideout y col., 1997; Schuster y col., 2004; Visvesvara y col., 2007; Siddiqui y col., 2008).

La EGA por *B. mandrillaris* es una infección crónica, subaguda, de desarrollo lento e insidioso, pudiendo desarrollarse en un tiempo de 2 semanas a 2 años, no presenta estacionalidad y por lo tanto puede darse en cualquier época del año (Martinez y col., 2001; Visvesvara y col., 2006).

Los síntomas de la infección del SNC incluyen: dolor de cabeza, fotofobia, nauseas, vómitos, fiebre, mialgias, pérdida de peso, etc. En estos pacientes es común la presencia de lesiones cutáneas, muchas veces antecediendo a los síntomas neurológicos, principalmente en la parte media del rostro; también pueden presentar rinitis, sinusitis u otitis (Deetz y col., 2003; Bravo y col., 2006; Seas y col., 2006).

Diagnóstico:

En las infecciones cerebrales el examen del LCR es orientativo. Este presenta niveles de proteínas elevados, pleocitosis por linfocitos, y niveles de glucosa normales o disminuidos, además de ser bacteriológicamente estéril.

Las técnicas de diagnóstico por imágenes muestran lesiones ocupantes de espacio en el cerebro pero que requieren de un diagnóstico diferencial con otras patologías (Visvesvara y col., 2007).

Es difícil la recuperación de la ameba del LCR; para el diagnóstico correcto es importante el análisis de material de biopsias tanto de piel, como de tejido cerebral.

El cultivo de estas amebas a partir de material de biopsias requiere de técnicas de cultivos celulares, donde suelen utilizarse monocapas de células de riñón de mono (E6), fibroblastos humanos de pulmón, y células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (Rideout y col., 1997). Estas técnicas requieren de laboratorios especializados.

Una herramienta que ha resultado útil en el diagnóstico de las infecciones por *B. mandrillaris*, es la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra *Balamuthia* sobre cortes histológicos del material de biopsia (Visvesvara y col., 2007).

Otro método que permitiría su clasificación es la observación de los quistes presentes en la lesión por microscopía electrónica de transmisión (MET), donde es posible observar la triple pared característica del género, lo cual también requiere de centros especializados en el manejo de las muestras para MET. Protocolos de PCR con pares de *primers* específicos para *Balamuthia*, así como de Real time PCR, han sido desarrollados para la identificación específica de este género. Estas técnicas reducen el tiempo de diagnóstico a aproximadamente 5 horas, lo que contribuye a la aplicación del tratamiento adecuado en forma temprana (Booton y col., 2003; Schuster y col., 2003; Qvarnstrom y col., 2006¸ Ahmad y col., 2011).

El aislamiento e identificación de *Balamuthia* de las muestras de tejido, requieren de técnicas y de equipamiento especializado, lo que no hace posible su búsqueda en laboratorios de análisis clínicos de rutina y requiere su derivación a centros de referencia.

Tratamiento:

No existe un tratamiento efectivo frente a una infección por *B. mandrillaris*. Esto, sumado a la dificultad del diagnóstico, complica aún más la situación del paciente. Casos sospechosos de infección por *Balamuthia* se han tratado empíricamente con mezclas de agentes esteroides, antibacterianos, antifúngicos y antiviralres (Ahmad y col., 2013).

Existe el registro de tres pacientes que sobrevivieron a la infección al ser tratados con una combinación de isotionato de pentamidina, sulfadiazina, claritromicina, fluconazol y flucitosina (5-fluorocitosina) (Deetz y col., 2003; Jung y col., 2003), y solo 4 niños sobrevivieron a la infección (Deetz y col., 2003; Visvesvara y col., 2011; Cary y col., 2010; Moriarty y col., 2013)

Al igual que con la otras AVL que se mencionan en el capítulo, la precocidad del diagnóstico y el tratamiento efectivo aumentan notablemente las chances de una evolución favorable de la infección (Moriarty y col., 2013).

Se han registrado más de 200 casos de infecciones por *B. mandrillaris* alrededor del mundo (Blake y col., 2013; Lorenzo-Morales y col., 2013, Bravo y col., 2012; Cary y col., 2010)*;* en Europa, Australia, Tailandia, Japón y otros países asiáticos (Itho y col., 2014; Khurana y col., 2015). También se han detectados casos en EEUU, Canadá y México (Moriaty y col., 2013; Lares-Jiménez y col., 2014). En Sudamérica se documentaron casos en Argentina, Venezuela, Brasil, Perú y Chile (Taratuto y col., 1991; Martinez y col., 1997; Riestra-Castañeda y col., 1997; Recavarren-Arce y col., 1999; Cabello-Vilchez y col., 2014). Recientemente se registró un caso fatal de infección por *B. mandrillaris* en un niño de 22 meses de edad, en la provincia de Santiago del Estero, Argentina, 2012 (Visvesvara, Comunicación personal).

1.4 Acanthamoeba spp.

Las especies pertenecientes a este género se encuentran ampliamente distribuidas, siendo el protozoo más prevalente en el ambiente. Se ha aislado de aguas naturales y envasadas, piscinas, sedimentos, tierra, polvo, etc. En lentes de contacto y sus estuches, así como también contaminado cultivos celulares (Marciano-Cabral y col., 2003; Oddó, 2006; Visvesvara y col., 2007; Stockman y col., 2011; Siddiqui y col., 2012; Tanveer y col., 2013; Bradbury y col., 2014). Dada su presencia en todos los ambientes en los que se la ha investigado se aplica el término ubicuista para describir a *Acanthamoeba* (Siddiqui y col., 2012). Los seres humanos estamos naturalmente expuestos a estos protozoos, como lo demuestra la presencia de anticuerpos (Ac) anti-*Acanthamoeba* en el 100% de los sueros analizados en Nueva Zelanda y en mas del 85% de los individuos investigados en Londres (Cursons y col., 1980; Brindley y col., 2009)

Su descubrimiento data de 1913, cuando Pushkarew aisló una ameba del polvo que denominó *Amoeba polyphagus*, redescripta por Page en 1967 como *Acanthamoeba polyphaga* (Pushkarew, 1913; Page, 1967).

En 1930, Castellani descubre, como contaminante en cultivos de *Cryptococcus pararoseus,* una ameba de aspecto redondeado que fue rebautizada, al año siguiente, como *A. castellanii* (Castellani, 1930).

Volkonsky en 1931 crea el género *Acanthamoeba*, compuesto por amebas con quistes rodeados de doble pared con la externa irregular, y caracterizadas por la formación de husos mitóticos notables (Volkonsky, 1931).

Durante las décadas siguientes se mantuvo en discusión cuáles eran los criterios óptimos para su clasificación (Singh, 1950; Pussard, 1966), hasta que en el año 1967, Page, consideró que la presencia de acantópodos, subseudópodos espinosos que forman desde la superficie celular, y la morfología de los quistes, son criterios suficientes para su ubicación genérica.

En el año 1958 se descubre el poder patógeno de *Acanthamoeba*. Durante el desarrollo de la vacuna contra la poliomielitis, Culbertson aisló de cultivos tisulares de riñón de mono lo que pensó era un virus desconocido, que producía efecto citopático in vitro, y muerte de

ratones y monos inoculados. Más tarde y luego de estudios más puntuales, demostraron que el microrganismo aislado debía ser clasificado como *A. culbertsoni* (Culbertson y col., 1958; Culbertsosn y col., 1959).

En 1972 se registra el primer caso encefalitis claramente atribuido a este género, y en 1974 se reporta el primer caso de queratitis por *Acanthamoeba* (Jager y col., 1972; Nagington y col., 1974).

Ciclo de Vida: *Acanthamoeba* alterna entre un estadio de trofozoíto, metabólicamente activo, capaz de reproducirse y un estadio quístico, que es la forma de resistencia y diseminación (Fig. 1.5).

El trofozoíto presenta un tamaño que varía de 15 a 50 µm, dependiendo de la especie y las condiciones del cultivo. Se caracteriza por la emisión de seudópodos de longitudes variables responsables de la locomoción, tipo babosa, común en las amebas. También proyectan subseudópodos, denominados acantópodos, por su aspecto ahusado, de allí el prefijo "*acanth*" del griego: aguja, que además le da nombre al género. Estos son útiles para la adhesión a superficies, el movimiento y la captura de alimento, tales como bacterias, levaduras, algas y otros protozoos (Allen y col., 1990; Weekers y col., 1993; Khan 2006). Su presencia es el principal criterio morfológico utilizado para la clasificación a nivel de género (Page 1967).

Su citoplasma es abundante, vacuolado, se destaca claramente su núcleo único con un gran nucléolo central refringente en preparaciones en fresco. En estas preparaciones también se visualiza claramente una vacuola pulsátil, de exclusión de agua, encargada de mantener el equilibrio osmótico celular (Bowers y col., 1973; Capitulo 4).

Cuando las condiciones de crecimiento se vuelven adversas, falta de alimento, temperatura y pH extremo y/o cambios en la osmolaridad del medio, el trofozoíto inicia el proceso de enquistamiento; se reabsorben las prolongaciones citoplasmáticas y la célula se redondea lo que conduce a un quiste maduro cuyo diámetro varía de 5 a 20 µm (Weisman 1976).

La morfología y el tamaño de los quistes varían para diferentes especies y con las condiciones de cultivo, pero en todos los casos están rodeados por una doble pared; la externa, exoquiste, ondulada, que contiene proteínas y lípidos, y la interna denominada endoquiste que puede ser poliédrica, estrellada u oval, que contiene celulosa (Visvesvara 2007; Khan 2006). Estas dos capas están separadas por un espacio en toda la superficie salvo donde se forman los ostiolos (Bowers 1969). Estas últimas estructuras sirven para monitorear las condiciones ambientales y como puerta de salida para el trofozoíto (Page, 1967).

La doble pared quística parece ser la responsable de la extrema resistencia que presentan los quistes a la desecación, a la falta de alimento, a la mayoría de los agentes químicos (cloración, antibióticos, desinfectantes) y a los agentes físicos (calor, congelación, radiación UV) (De Jonckhere y col., 1976; Brown y col., 1977; Turner y col., 2000; Lloyd y col., 2001; Aksozen y col., 2002).

Mazur y col., en 1995, documentaron que estos quistes permanecen viables luego de haber sido conservados durante 24 años en agua a 4ºC, e incluso mantienen su patogenicidad en animales de experimentación.

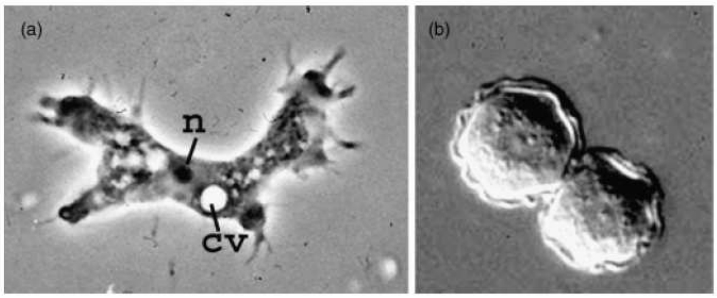


Figura 1.5: *Acanthamoeba castellanii*, a: trofozoíto, b: quiste. Imagen extraída de Visvesvara y col. 2007.

Clasificación:

Como se comentó anteriormente la clasificación a nivel de género se realiza en base a las características morfológicas de los trofozoítos caracterizados por la presencia de proyecciones espinosas en su superficie (Page, 1967).

Clasificarlas a nivel de especie resultó mucho más complicado, razón por la cual, Pussard & Pons (1977) a partir de las 18 especies identificadas determinaron tres grupos, basados en la morfología y tamaño de los quistes de cada aislamiento:

Grupo I (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, y *A. tubiashi*) caracterizado por trofozoítos y quistes grandes (> 18 µm) con endoquiste estrellado y exoquiste esférico, con un amplio espacio entre ellos. El quiste presenta más de seis brazos.

Grupo II (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. mauritaniensis*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. hatchetti*, y *A. triangularis*), dentro de este grupo se encuentran las especies aisladas con mayor frecuencia. Los quistes son más pequeños (< 18 µm), endoquiste poligonal y exoquiste arrugado.

Grupo III (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, y *A. royreba*), con quistes pequeños (< 18 µm), endoquiste redondo o suavemente angular y exoquiste liso o ligeramente arrugado.

Si bien esta clasificación se emplea en la actualidad, es poco específica ya que las características morfológicas son muy dependientes de las condiciones de cultivo (Visvesvara, 1991).

Actualmente lo que se utiliza para la clasificación y la filogenia de este género es la secuenciación del ADNr 18S. El análisis de estas secuencias permitió establecer 17 genotipos diferentes, T1 a T17 (Stothard y col., 1998; Booton y col., 2005; Corsaro y col., 2010; Nuprasert y col., 2010). En las últimas publicaciones sobre aislamientos y clasificación se tiende a determinar el genotipo de la ameba más que la determinación de especie utilizada clásicamente. (Stothard y col., 1998; Gast y col., 2001; Hewett y col., 2003; Marciano-Cabral y col., ,2003; Khan 2006; Köshler y col., 2006).

Infecciones:

Las diferentes especies de *Acanthamoeba* pueden afectar al ser humano comportándose como agentes patógenos oportunistas o no oportunistas.

Como oportunista afecta a personas inmunocomprometidas, ya sea pacientes con SIDA, con terapia inmunosupresora, quimioterapia o alguna otra enfermedad debilitante, ocasionando EGA. Con menor frecuencia produce Acanthamebosis cutánea (AC), sinusitis y amebosis diseminada (Feingold y col., 1998; Steinberg y col., 2002; Khanna y col., 2014).

Como no oportunista es el agente causal de la Queratitis Amebiana (QA) (Siddiqui y col., 2012)

-Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA):

La EGA es una enfermedad oportunista de curso lento y crónico que afecta al SNC y en la mayoría de los casos termina con la vida del paciente en un período que puede ir de varias semanas a meses (Martinez y col., 1997; Schuster y col., 2004; Visvesvara y col., 2006, Satiln y col., 2013). Es una patología que no presenta estacionalidad, por lo que puede darse en cualquier época del año.

Los síntomas son los de una infección meníngea, rigidez en la nuca, dolor de cabeza, fotofobia, confusión, fiebre, vómitos, etc.

La vía de ingreso de los trofozoítos al organismo no está del todo clara, puede ser por el epitelio neuro-olfatorio, tracto respiratorio superior, lesiones en la piel o por vía genitourinaria. La infección llegaría al SNC por diseminación hematógena desde la piel o los pulmones, o bien directamente a través del epitelio neuro-olfatorio (Marciano-Cabral y col., 2003).

Una vez en el tejido cerebral, los trofozoítos de *Acanthamoeba* fagocitan las células del hospedador a través de una estructura similar al amebostoma de *Naegleria.* Además, secretan una batería de enzimas que destruyen la matriz extracelular y la proveen de nutrientes para su crecimiento; fosfolipasas, serina y cisteína proteinasa, metaloproteinasas, activador del plasminógeno, etc, facilitan el avance e invasión de la ameba en los tejidos (Visvesvara y col., 2007).

En las autopsias de pacientes con EGA, el cerebro se encuentra edematizado, con áreas necróticas y hemorrágicas y pueden verse trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* en los cortes histológicos. Se observan lesiones necrotizantes hemorrágicas, severa irritación meníngea y encefalitis. Las células gigantes multinucledas forman granulomas en el tejido cerebral siendo este tipo de respuesta mínima o ausente en los pacientes inmunodeprimidos. Estos pacientes también pueden desarrollar lesiones en la piel, nódulos eritematosos o abscesos (Martinez y col., 1997; Schuster y col., 2004; Visvesvara y col., 2006).

Diagnóstico:

El diagnóstico de EGA es bastante problemático debido a la similitud con afecciones bacterianas o virales y por la falta de familiarización con esta etiología.

El LCR presenta pleocitosis linfocítica y aumento de polimorfonucleares, glucosa ligeramente disminuida, aumento de proteínas, y es bacteriológicamente estéril (Marciano-Cabral y col., 2003).

Las imágenes obtenidas por tomografía computada o resonancia magnética muestran lesiones multifocales indicando la presencia de abscesos o masas tumorales, lo cual indica compromiso del SNC pero no confirma la causa (Rivera y col., 2002; Shi y col., 2004; Schuster y col., 2006; Kumar y col., 2007).

Los frotis del LCR o cortes de tejido infectado se tiñen con Giemsa, Hematoxilina-Eosina, Ticrómica, Naranja de acridina o Calco flúor White, lo que resalta las características morfológicas de la AVL y facilita su visualización (Khan, 2006; Marciano-Cabral y col., 2003). En estas tinciones los trofozoítos de *Acanthamoeba* se distinguen de macrófagos y otras células inmunes por sus características nucleares, gran cariosoma central y un halo claro que rodea al núcleo. Pueden emplearse técnicas de inmunomarcación con sustancias fluorescentes o inmunofluorescencia directa (Marciano-Cabral y col., 2003; Salomon y col., 2008; da Rocha-Azevedo y col., 2009, Costamagna y col., 2014).

En los laboratorios de rutina, cuando se sospecha de etiología amebiana en un paciente con compromiso del SNC, se recomienda realizar cultivo en ANN de unas gotas de LCR o

bien de la biopsia cerebral para el aislamiento de *Acanthamoeba*, y también de otras amebas.

En personas sanas se detectan altos niveles de Ac contra *Acanthamoeba*, formados en etapas tempranas de la vida, lo que permite su opsonización y eliminación por macrófagos y Neutrófilos (Cursons y col., 1980; Khan, 2006; Salomon y col., 2008; Brindley y col., 2009). En estos individuos, *Acanthamoeba* no es capaz de evadir el sistema inmune, ya que además de los Ac, su suero tiene actividad amebicida y se produce la activación del complemento por vía alternativa, destruyéndola también, de una manera Ac independiente. El diagnóstico serológico en pacientes inmunocomprometidos carece de utilidad, ya que su posibilidad de generar respuesta inmune se encuentra vedada por la rápida evolución del cuadro y la ubicación (ojo o cerebro) del protozoo.

Para los pacientes inmunosuprimidos el principal factor de riesgo para contraer EGA es la exposición a aguas contaminadas (Khan, 2006).

El diagnóstico también puede realizarse por técnicas de biología molecular, principalmente por PCR.

Tratamiento: no existe una terapia adecuada para el tratamiento de esta patología. *Acanthamoeba* es resistente a la mayoría de los agentes antimicrobianos y a ello se le suma la dificultad para que estos atraviesen la barrera hematoencefálica.

Se emplean combinaciones de diferentes principios: fluconazol, sulfadiazina, ketoconazol, anfotericina, bitraconazol, algunos de los cuales tienen severos efectos secundarios (Singhal y col., 2001; Gupta y col., 2008). Estudios recientes han mostrado buenos resultados con una combinación de rifampicina, sulfametoxazol trimetoprim y ketoconazol (Khanna y col., 2014).

Son pocos los pacientes que sobreviven a esta infección, un diagnóstico y tratamiento temprano aumenta las posibilidades de éxito (Marciano-Cabral y col., 2003).

-**Acanthamoebosis Cutánea (AC):**

La lesiones en piel por *Acanthamoeba* pueden representar la vía de entrada al organismo a partir de la cual ocurra la diseminación hematógena hacia otros órganos, o bien, contrariamente ser la manifestación de una infección diseminada por el torrente sanguíneo desde otro órgano afectado, como cerebro, pulmones, etc (Marciano-Cabral y col., 2003; Khan, 2006; Salomon y col., 2008).

La AC se caracteriza por la formación de nódulos eritematosos duros y úlceras en la piel con exudado de material purulento. El examen histológico de estas lesiones muestra focos de necrosis rodeados de reacción inflamatoria con quistes y trofozoítos (Marciano-Cabral y col., 2003; Khan, 2006; Salomon y col., 2008, Castillon y col., 2013). Puede presentarse o no con compromiso del SNC. En el primer caso, su diagnóstico y tratamiento es esencial para prevenir afecciones cerebrales.

Para su diagnóstico pude realizarse cultivo en ANN de material de las lesiones o biopsias que se tiñen con Hematoxilina-Eosina, Calco flúor White (CFW) o ácido peryódico de Schiff. También pueden emplearse Inmunofluorescencia o PCR (Marciano-Cabral y col., 2003; Khan, 2006, Costamagna y col., 2014).

Igual que para la afección cerebral, no hay un tratamiento efectivo. Para tratar la AC se utiliza la aplicación tópica de itraconazol, 5-fluorocitosina, pentamidina, ketoconazol y clorohexamidina. (Khan, 2006). La mortalidad documentada para esta infección es del 73% sin compromiso del SNC, y asciende al 100% cuando afecta el SNC (Torno y col., 2000; Marciano-Cabral y col., 2003).

-**Queratitis Amebiana (QA):**

La QA es una enfermedad corneal sumamente dolorosa con compromiso serio de la visión. Afecta a personas inmunocompetentes y no se desarrolla inmunidad protectiva por lo que son posibles las reinfecciones (Niederkorn y col., 1999).

Son varias las especies de *Acanthamoeba* que pueden producir esta patología, *A. castellamii, A. polyphaga, A. hatchetti, A. culbersoni, A. rhysodes, A. griffini, A. quina, y A.*

luddunensis (Moore y col., 1985; Moore y col., 1987; Bacon y col., 1993; Schaumberg y col., 1998). La mayoría perteneciente al genotipo T4 (Siddiqui y col., 2012).

Los principales factores de riesgo son: malos hábitos de higiene en el uso de las lentes de contacto, el empleo de soluciones de limpieza caseras, y la presencia de abrasiones en el epitelio corneal. Las lesiones en la córnea producidas por cuerpos extraños, comunes en soldadores y otras profesiones, y la exposición a aguas contaminas también representan un factor de riesgo (Auran y col., 1987; Donzis y col., 1987; Stehr-Green y col., 1989; Illingworth y col., 1995; Khan, 2006).

Aparentemente la infección por esta ameba en la córnea, no se produce a menos que exista una lesión corneal previa. La expresión de las gliproteínas que le sirven de anclaje a *Acanthamoeba* se expresen 1.8 veces más en córneas dañadas que en sanas (Taylor 1997).

Los síntomas de QA son variables, puede presentarse con excesiva producción de lágrimas, fotofobia y defectos epiteliales, formación de abscesos y edema. Lo más característico es un dolor sumamente intenso, por neuritis radial, y la presencia de un anillo de infiltrado estromal que rodea la lesión (Niederkorn y col., 1999; Marciano-Cabral y col., 2003; Khan, 2006; Panjwani 2010).

Diagnóstico:

El método de diagnóstico parasitológico se basa en la búsqueda de *Acanthamoeba* en material de biopsia o raspado corneal previo cultivo en ANN. Por este método se amplifica el número de protozoarios lo que facilita su hallazgo y provisión para estudios posteriores. Además, la búsqueda de la ameba en los estuches y en los líquidos de lavado por medio de cultivos orienta el diagnóstico (Moore y col., 1989; D'Aversa y col., 1995; Illingworth y col., 1995; Armstrong, 2000; Marciano-Cabral y col., 2003; Borin y col., 2013).

Puede destinarse una porción de la biopsia para la realización de tinciones que contribuyen al diagnóstico: Inmunofluorescencia directa, CFW (tiñe la pared de los quistes), naranja de acridina o microscopía confocal (Winchester y col., 1995; Vaddavalli y col., 2011).

Pueden aplicarse técnicas de biología molecular, como PCR, basada en secuencias de 18s rRNA (Lehmann y col., 1998; Khan y col., 2001; Schroeder y col., 2001), o técnicas de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes específicas de género (Stothard y col., 1999; Qvarnstrom y col., 2006; Siddiqui y col., 2012). Al igual que con los otros géneros mencionados en el capítulo, el diagnóstico mediante técnicas moleculares para infecciones causadas por *Acanthamoeba* tiene la ventaja del corto tiempo necesario para la obtención de un resultado específico.

Comúnmente se utiliza la técnica de PCR con el par de *primers* denominados JDP1/JDP2 (Stothard y col., 1998), específicos para el género *Acanthamoeba.* Con estos *primers* se obtiene un producto de PCR específico del género que además, mediante su secuenciación, permite la clasificación en genotipos de los aislamientos. Este protocolo, publicado por Schroeder y col., en 2001, puede aplicarse tanto a muestras clínicas como a muestras ambientales.

En Argentina se registraron un total de 27 casos publicados de QA: 16 en Mendoza (Lucchesi y col., 2010), 5 en Santa Fe (Nardin y col., 2008), 2 en Bahía Blanca (Gertiser y col., 2010; Bermudez, 2010) , 4 en el resto de la provincia de Buenos Aires (D´Alessandro y col., 2007; Latapie y col., 2008; Gonzalez Moccia y col., 2009 y Menghi y col., 2012) y 20 en una revisión no publicada en el Hospital Santa Lucía (2009-2010) realizada por Guisasola, 2011. Hasta el momento, no existen registros de EGA causadas por *Acanthamoeba* spp.

Tratamiento:

La QA se trata con la administración tópica de biguanidas (polihexametilen biguanida 0,02% o clorhexidina dicluconato 0,02%) combinadas con alguna diamidina; un antibiótico para las infecciones bacterianas asociadas, un analgésico y antiinflamatorios esteroideos (Marciano-Cabral y col., 2003; Perez-Santonja y col., 2003).

La terapia inicial implica aplicaciones cada hora durante el día y la noche, los primeros 2 a 3 días. En los 3 o 4 días siguientes sólo se aplica durante el día y a cada hora. Durante el resto del primer mes, se hacen aplicaciones cada dos horas, seguidas de 6 aplicaciones por

día durante los siguientes meses hasta completar un año (Dra. Erna Giagante, comunicación personal). Por lo tanto, el tratamiento es muy prolongado y su administración es de baja comodidad para el paciente, provocando molestias y perjuicios económicos. El éxito terapéutico depende de su pronta instauración y del cumplimiento de su posología para minimizar las posibilidades de recrudescencias de la enfermedad (Khan, 2006).

Los quistes son menos susceptibles a la acción de las drogas y pueden permanecer por mucho tiempo en el estroma corneal y serían los responsables de las recurrencias de la QA (Martinez y col., 1997).

1.5 *Sappinia* sp.

Tradicionalmente el género *Sappinia* estaba compuesto por solo dos especies: *Sappinia diploidea y Sappinia pedata;* pero recientemente se descubrió una alta diversidad genética que sugiere la existencia de nuevas especies (Wylezich y col., 2015). Si bien la descripción de este género data del 1900, el interés clínico aumentó a partir del descubrimiento de su poder patógeno en 2001.

Las amebas pertenecientes a este género son lobosas y en su ciclo de vida alternan entre el estadio de trofozoíto y quiste (Fig. 1.6).

Los trofozoítos de *Sappinia* miden de 50 a 60 µm de longitud por 20 a 30 µm de ancho y presentan un par de núcleos unidos, que es la característica distintiva de género. La locomoción es monopodial, formando una gran "lengua" de hialoplasma, a diferencia de los otros géneros mencionados. Las células están cubiertas por una capa amorfa de 30 a 90 nm de espesor (Walochnik y col., 2010).

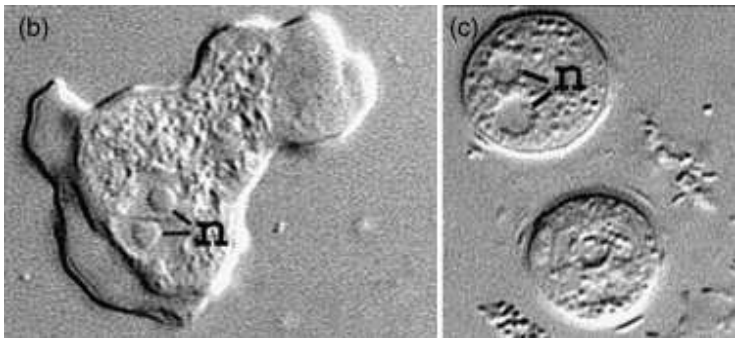


Figura 1.6: *Sappinia diploidea*, b: trofozoíto, c: quiste, n: núcleos. Imagen extraída de Visvesvara y col., 2007

Durante el proceso de enquistamiento, las amebas se agrupan de a pares, rodeándose de una sola pared. Los trofozoítos permanecen separados dentro del quiste por un septo en forma de ¨S¨ característico de las cepas de *S. diploidea*. Posteriormente los trofozoítos y sus núcleos se fusionan formando un quiste binucleado, proceso complejo que se parece al proceso de reproducción sexual, y en un cultivo fresco pueden encontrarse varios

estadios intermediarios de este proceso, (Nägler, 1909; Goodfellow y col., 1974; Walochnik y col., 2010).

Los quistes maduros son redondeados, pequeños, de 18-25µm de diámetro, rodeados por una doble pared (Fig. 1.7).

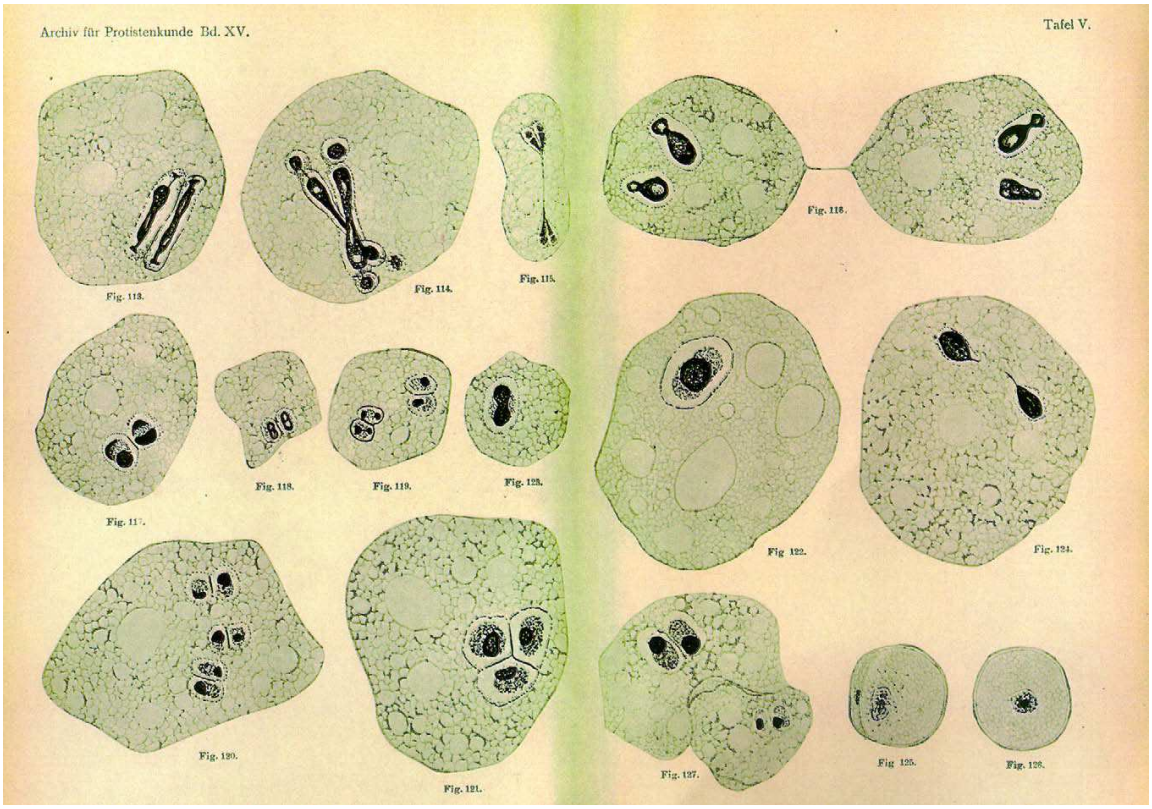


Figura 1.7: División celular de *Sappinia diploidea* (Nägler, 1909). División nuclear (113–118): extensión del cariosoma (113), separación de las masas nucleares (115), división (116) de la célula, después de completar la división celular externa la cromatina se disuelve (117) y forma un anillo alrededor de cariosoma (118), células multinucleadas como resultado de la división nuclear sin división celular posterior (119–120), con tres núcleos como resultado de la división no sincrónica (121), quiste anormal con la degeneración de un gameto (125), quiste con un solo núcleo como resultado de la fusión (126), dos trofozoitos antes de formar un quiste de la cópula (127). Imagen extraida de Walochnik, J., y col., 2009.

Las especies pertenecientes a este género se han aislado de la tierra (Nägler, 1909), de las heces de lagartos (Hartmann 1908), alces, bisontes y de ganado vacuno, por lo que se las

clasifica como coprozoicas (Levine, 1961; Goodfellow y col., 1974). También se han encontrado en muestras ambientales (Michel y col., 2006; Brown y col., 2007; Wylezich y col 2009).

En 2001, Gelmant y col., describieron el primer y el único caso de infección humana por *Sappinia diploidea.* El paciente, masculino de 38 años, inmunocompetente, solo presentaba el antecedente de una infección sinusoidal. Desarrolló pérdida de conciencia, fotofobia, nauseas, vómitos, visión borrosa y dolor de cabeza frontal durante 2 a 3 días. Por resonancia magnética nuclear se observaron dos masas en el lóbulo temporal posterior izquierdo. El paciente fue operado para extraer las masas de su cerebro y tratado con azitromicina, pentamidina, itraconazol y flucitosina. El análisis del material biopsiado evidenció inflamación necrotizante hemorrágica que contenía microorganismos ameboides con dos núcleos unidos. Esta característica fue la determinó que se diagnostique como una infección por *S. diploidea*. No se observaron quistes en ese material. Cinco años después de la operación el paciente se encontraba sano y sin secuelas de la infección (Gelman y col., 2001).

El cultivo de estas amebas se realiza a temperatura ambiente en ANN cubierto con una suspensión de bacterias de acuerdo a lo publicado por Page, 1988.

1.6. AVL como “Caballos de Troya”

Las AVL actúan como “Caballos de Troya” al albergar en su interior bacterias y otros microorganismos. La asociación en la cual un organismo habita en el interior de otro organismo se denomina endosimbiosis y etimológicamente el término podría usarse para designar a cualquier proceso de simbiosis en el cual el simbionte reside en el interior del cuerpo de otro ser vivo (Starr, 1975).

Esta asociación le permite a los endosimbiontes permanecer, resistir y diseminarse en ambientes que no son los ideales para su crecimiento. La expresión de “Caballo de Troya” se utiliza para indicar que los microorganismos se encuentran en el interior de la ameba, y que ésta no es una “transportadora” que los lleva adheridos a su superficie (Khan, 2006; Greub y col., 2004; Marciano-Cabral y col, 2010).

En el interior de las AVL los microorganismos están protegidos de las inclemencias del ambiente, de las defensas del hospedador y de la acción de los agentes quimioterapéuticos utilizados para su control. Además los endosimbiontes pueden reproducirse, aumentando así su número para producir enfermedad.

En la década del 50´se descubrió que especies de *Acanthamoeba* estaban infectadas con bacterias, y recién en 1975 se documentó que éstas podían mantener una relación de endosimbiosis con las amebas (Drozanski, 1956, Proca-Ciobanu y col., 1975).

Se han demostrado bacterias intracelulares en AVL del género Acanthamoeba en aproximadamente el 20-24% de los aislamientos ambientales (Fritsche y col., 2000), y en el 26% de las amebas aisladas a partir de muestras de córneas (Marciano-Cabral y col., 2003).

Legionella spp., Francisella tularensis, Mycobacterium avium, Burkholderia spp., Vibrio cholerae, Listeria monocytogenes, Helicobacter pylori, Afipia felisand, *Escherichia coli* serrotipo O157 (Greub y col., 2004; Berger y col., 2006) son bacterias patógenas que utilizan a *Acanthamoeba* como célula hospedadora y como “Caballo de Troya” para su permanencia y diseminación.

En el 5% de los aislamientos de este género se encontraron, también, patógenos intracelulares obligados, como *Chlamydia*, Chlamydophila y bacterias "tipo-*Chlamydia*" como endosimbiontes.

Esta capacidad, de sostener el crecimiento de bacterias en su interior, sirve in vitro para el aislamiento en el laboratorio de patógenos intracelulares de distintas muestras clínicas utilizando cultivos puros de trofozoítos de *Acanthamoeba*. Esta técnica se aplicó para el aislamiento de *L. pneumophila* (Rowbotham, 1998), *L. anisa* (La Scola y col., 2001), y *Mycobacterium massiliense* (Adekambi y col., 2006) de muestras de esputos, abscesos y materia fecal.

Además de bacterias, Acanthamoeba puede transportar en su interior virus, levaduras y otros protozoos (Khan, 2009)

Se ha demostrado la capacidad de este género para actuar como reservorio de Minivirus, Coxsackievirus, Adenovirus, Poliovirus y otros. La permanencia de estos virus en el citoplasma de la ameba asegura su supervivencia y permite la transmisión entre hospedadores (Baron y col., 1980; Danes y col., 1981; Mattana y col., 2006; Lorenzo-Morales y col., 2007).

Entre las levaduras, *Crytococcus neoformans* tiene la capacidad de replicarse en el interior de Acanthamoeba. Evolutivamente esta relación le habría permitido desarrollar las adaptaciones necesarias para lograr virulencia sobre células de mamíferos (Khan, 2009).

Este género puede actuar también como "Caballo de Troya" de protozoos, como es el caso de *Cryptosporidium*. Se ha documentado que los trofozoítos de *Acanthamoeba* pueden albergar hasta seis ooquistes de este parásito, y que estos son lentamente eliminados al medio, lo cual juega un rol importantísimo en la transmisión de la Cryptospiridiosis (Gomes-Causo 2007).

Al igual que *Acanthamoeba*, se ha demostrado que Balamuthia puede actuar como célula hospedadora de *Legionella* (Shadrach y col., 2005), y que soporta el crecimiento intracelular de bacterias "tipo" *Chlamydia* (Michel y col., 2005).

Se ha demostrado in vitro, que *Naegleria fowleri* también soporta el crecimiento de bacterias intracelulares como *Legionella pneumophila*, pero no se ha reportado, hasta el momento, que aislamientos ambientales o de casos clínicos de esta AVL contenga endosimbiontes, lo que probablemente se deba a la sensibilidad que esta cepa presenta frente al estrés ambiental (Walochnik y col., 2005).

Como vemos las AVL no solo presentan riesgos en sí mismas, sino que, además de su propia patogenicidad, albergan en su interior microorganismos peligrosos para la salud del hombre y otros mamíferos y por ello es necesesario determinar la presencia de AVL en el ambiente.

Comentarios finales Capítulo I

Las técnicas para aislamiento y cultivo de *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Sappinia* fueron publicadas por Page en el año 1976 y 1988, y aún hoy representan la metodología de elección, tanto para muestras ambientales como biológicas. Son sencillas y económicas, y se pueden implementar en cualquier laboratorio de análisis clínicos, inclusive de muy baja complejidad.

No así es el caso de *Balamuthia mandrillaris*, que requiere de cultivos celulares para su aislamiento.

Hasta el momento, en el mundo existe el registro de aproximadamente 120 casos de EGA por *Acanthamoeba*. Este género es el responsable de más de 10.000 casos de QA registrados hasta el momento, 80% de los cuales están asociados al uso de lentes de contacto.

Más de 250 casos de MAP se atribuyen a infecciones por *N. fowleri*, la mayoría de los cuales se produjeron en Estados Unidos. Se han registrado aproximadamente 100 casos

de EGA por *Balamuthia* en todo el mundo, y solo un caso de infección humana por Sappinia diploidea.

Según estos datos se puede inferir que las infecciones por AVL en humanos presentan baja prevalencia, sin embargo esta aseveración es cuestionable dada la posibilidad de sub-diagnóstico para este tipo de agentes etiológicos.

De acuerdo con lo expuesto y dada la falta de conocimiento acerca de la presencia y distribución de las AVL en la República Argentina, el objetivo general de esta tesis fue aislar estos protozoarios del medio ambiente, en distintas regiones de nuestro país, y de muestras clínicas. Los objetivos particulares fueron: Clasificar taxonómicamente cada aislamiento a partir del estudio de las características morfológicas, termofílicas y moleculares. Realizar el análisis ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Evaluar la resistencia de las cepas obtenidas a productos desinfectantes. Estos objetivos se desarrollan en los capítulos siguientes.

Capítulo 2

Búsqueda y aislamientos de Amebas de Vida Libre (AVL)

2.1 AVL en la naturaleza

Tal como se expresó en la introducción del presente trabajo, una de las características más notables de las especies de *Naegleria* y de *Acanthamoeba* es su amplia presencia en la naturaleza.

Ambos géneros se han aislado de diferentes fuentes ambientales, y en todas partes del mundo. En el ambiente, *Naegleria fowleri* se la aislado del suelo, polvo ambiental, de aguas de piscinas, ríos y lagos. Las cepas virulentas son termofílicas, desarrollándose bien en climas tropicales con temperaturas entre 40-45°C, por lo que también se la halló en fuentes termales y de piscinas templadas (Cerva y col., 1982; Martínez y col., 1997; Gutiérrez, 2000; Schuster, 2002; Visvesvara y col., 2007; Kemble y col., 2012; Cope y col., 2015; Moussa y col., 2015). El género *Acanthamoeba* sobrevive en distintos ambientes, estando ampliamente distribuido en la naturaleza. Se aislaron especies Acanthamoeba de muestras de tierra, polvo, arena y aire; de aguas dulces de ríos, lagos y lagunas; de océanos, mares, y sus sedimentos, también en charcos y acequias y en aguas estancadas (Marciano-Cabral y col., 2003; Oddó, 2006; Visvesvara y col., 2007; Stockman y col., 2011; Siddiqui y col., 2012; Tanveer y col., 2013; Bradbury y col., 2014).

En nuestro país existen registros de aislamientos ambientales de AVL en las provincias de Mendoza, Corrientes y Córdoba.

En Mendoza se trabajó con muestras de aguas y de suelo. Se analizaron aguas utilizadas para riego, de piscinas y agua corriente. De las 25 muestras de aguas analizadas, 14 resultaron positivas para el aislamiento de AVL y de las 25 muestras de suelo, sólo 4

tuvieron cultivos positivos. Todos los aislamientos se clasificaron morfológica y molecularmente como pertenecientes al género *Acanthamoeba* (Lucchesi y col., 2010).
Según datos bibliográficos, en la provincia de Corrientes se analizaron aguas de ríos (n=288), de lagunas (n=384) y de piletas de natación (n= 216). El 85,3% de las mismas fue positivo para el aislamiento de AVL. En las aguas de piscinas el 100% de los aislamientos correspondió al género *Acanthamoeba*. Mientras que para las muestras de ríos y lagunas se aisló, además del género *Acanthamoeba,* el género *Naegleria* en el 56% y 61% de las mismas, respectivamente, siendo este último el único registro de la presencia de este género en nuestro país (Gorodner y col., 2006).

En la provincia de Córdoba, República Argentina, entre enero de 2009 y diciembre de 2012 se analizaron un total de 142 muestras en búsqueda de AVL, 8 muestras ambientales, y 134 muestras de abscesos corneales y líquidos conservantes de lentes de contacto. Solo 8 de estas muestras fueron positivas para AVL: 2 de aguas de fuentes, 1 proveniente del líquido conservante de lentes de contacto, 2 de epitelio corneal de pacientes con queratitis amebiana y 3 de solución salina de escobillados anales con AVL, y de ellas solo el 50% se confirmó por biología molecular como perteneciente al género *Acanthamoeba* (Laconte y col., 2013).
Dada su ubicuidad y el desconocimiento sobre su distribución en nuestro país, el objetivo de este capítulo fue determinar la presencia de AVL en muestras ambientales (aguas naturales, de recreación y de consumo), en distintas regiones de la República Argentina, y en muestras clínicas humanas provenientes de procesos patológicos.

2.1.1 Ecoepidemiología de AVL en Bahía Blanca.

Introducción:

La Bahía Blanca (o estuario) es un accidente geográfico del mar Argentino situado en la transición entre las regiones pampeana y patagónica. Esta bahía es una profunda y angosta entrada de mar en el continente. Su nombre le otorgó el propio a la ciudad más importante próxima a sus riberas, la ciudad de Bahía Blanca. Es la ciudad cabecera del partido de Bahía Blanca, el cual presenta una superficie de 228.000 hectáreas y se ubica en el sector norte del canal principal del estuario.

Bahía Blanca es una ciudad costera ubicada en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, a 38° 44" de latitud sur y 62° 16" de longitud oeste; a 730 km al sur de la Capital Federal. Fue fundada en 1828 y se destaca por su rol de "metrópoli regional" y por su cercanía al puerto de Ingeniero White, primer puerto de aguas profundas de Argentina. Tiene una población, según el último censo (año 2010) de 301.572 habitantes, siendo el principal centro urbano del partido, concentrando el 92,3 % de la población del mismo (Fig. 2.1).

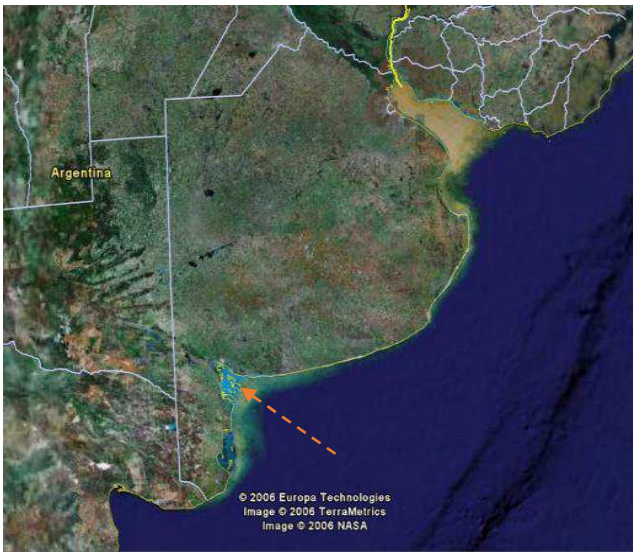


Figura 2.1: Ubicación de Bahía Blanca (flecha) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina

La ciudad presenta una base agrícola –ganadera, consolidándose como centro urbano, y asentamiento de importantes empresas agroindustriales y del sector petroquímico.

Esta bahía posee características estuariales y se postuló que la misma se formó por un río de gran caudal que desapareció o cambió su recorrido. Sólo dos cursos fluviales permanentes vierten sus aguas en esta bahía, el río Sauce Chico y el arroyo Napostá Grande.

El Arroyo Napostá Grande forma parte de la región de influencia del estuario de Bahía Blanca, cuyo dominio continental comprende el sector sudeste de la provincia de La Pampa y una parte del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Camarata, 1982). La cuenca del arroyo Napostá Grande posee un área de 1.237 km^2, siendo la extensión de su curso principal de 105 Km, nace en el cerro homónimo y fluye con un leve rumbo Este-Oeste convergiendo hacia el Sur, luego de recorrer una corta distancia desde su origen. En el sector medio su cauce adquiere un pronunciado trayecto semicircular para luego retornar abruptamente en dirección hacia el estuario, atravesando la ciudad de Bahía Blanca en sentido noroeste-sudoeste (Fig. 2.2).

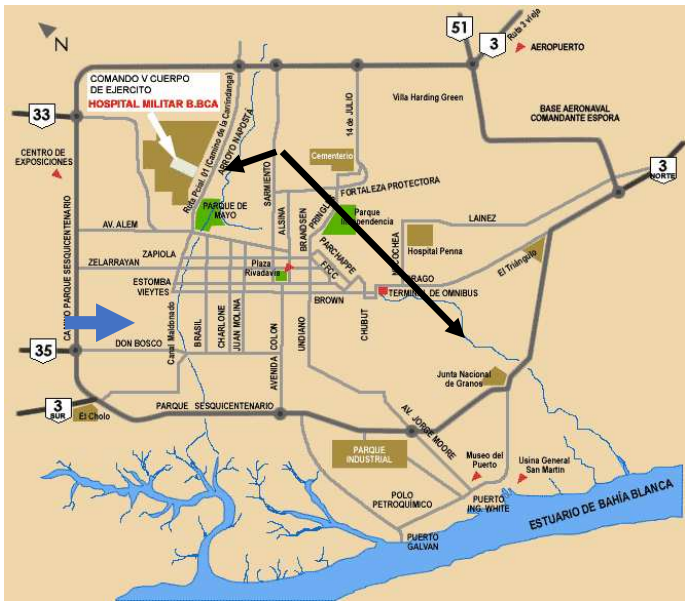


Figura 2.2: Plano de Bahía Blanca, con Arroyo Napostá (flechas negras) y Canal Maldonado (flecha azul).

La cuenca inferior del Arroyo se extiende desde el paraje Puente Canesa, a 20 Km de la ciudad de Bahía Blanca, hasta la desembocadura en el estuario, atravesando la ciudad. En este tramo el arroyo no recibe aportes significativos de otros caudales.

En el área urbana de la ciudad de Bahía Blanca el arroyo ha sido canalizado y durante una parte de su curso se encuentra entubado, lo cual le permite escurrir con un caudal de 40 $m^3.s^{-1}$. Diez kilómetros antes de su desembocadura, se bifurca en el curso principal y el arroyo Maldonado. Ambos arroyos pueden drenar 300 $m^3.s^{-1}$ de agua del área urbana y conjuntamente demarcan el antiguo cono aluvial del arroyo Napostá Grande (Melo, 2004).

Por sus características climáticas, el Suroeste bonaerense está comprendido en la franja planetaria de climas templados con veranos e inviernos bien marcados y primaveras y otoños moderados. El clima del sudoeste se define como un tipo transicional, entre el cálido y húmedo clima del este de la provincia de Buenos Aires, y el clima frío y seco que predomina en la Patagonia (Capelli y col., 2006). El clima del sector este es también transicional graduando hacia un subtipo húmedo hacia Bahía Blanca.

Las temperaturas medias anuales están comprendidas entre 14 ºC y 20 ºC, con registros que frecuentemente llegan a valores extremos durante la estación cálida, habiendo llegado en el verano de 2014, a temperaturas de hasta 49 grados centígrados, marcas poco habituales en décadas anteriores. En cuanto a las precipitaciones medias, durante el período 1970 a 2008, se determinó que fueron de 841,1 mm al sudeste y 380 mm al sudoeste (Campo y col., 2008).

Por otra parte Bahía Blanca se caracteriza por ser ventosa con flujo predominante de los sectores Norte y Noroeste y velocidades medias de 24 $Km.h^{-1}$. La rugosidad urbana, la canalización de los vientos y la influencia de la isla de calor modifican la velocidad y la dirección del viento, con una notable aceleración de flujo en torno de los edificios (Capelli y col., 2006).

Si bien no está permitido el uso recreacional de las aguas del Arroyo Napostá y del canal Maldonado, en muchos sectores de la ciudad es utilizada como tal en los meses cálidos. Estas aguas podrían comportarse como una fuente importante de exposición a parásitos y otros agentes causales de enfermedad para los usuarios.

2.1.1.a. Amebas de Vida Libre (AVL) y el agua:

Objetivos:

El objetivo de esta sección fue la búsqueda de AVL en aguas recreacionales de Bahía Blanca y en agua destinada a consumo, proveniente de tanques domiciliarios y de grifos conectados directamente a la red de distribución de agua potable, y en diferentes puntos de la ciudad. Para ello, durante el periodo 2007-2008 se realizó la toma de muestras de agua en: ***piscinas*** (natatorios) cubiertas, utilizadas para enseñanza y entrenamiento; en el ***Arroyo Napostá***, que atraviesa la ciudad, que si bien no es un sitio permitido como balneario, en algunos sectores de su recorrido se lo utiliza como tal y en diferentes domicilios (***agua de red***).

Materiales y métodos:

Piscinas cubiertas:

Se estudiaron 7 piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina durante la primavera de 2007 y verano, otoño e invierno de 2008. En cada pileta se tomaron, por estación, cuatro muestras en frascos de vidrio estériles de 470 ml de capacidad, tres para la búsqueda de AVL: una del fondo, una de superficie y una de raspado de pared; la cuarta se destinó al análisis bacteriológico. Se colectaron un total de 84 muestras para investigar la presencia de AVL. En cada establecimiento se registraron datos de temperatura ambiental, temperatura del agua, pH y concentración de cloro.

Arroyo Napostá:

Inicialmente se realizó un muestreo en 20 puntos, en un recorrido aproximado de 500 m (Fig. 2.3), con una distancia estimada entre cada uno de ellos de 25 m. Luego se procedió al muestreo estacional de dos de los sitios separados por aproximadamente 300 m (Fig. 2.4) recogiendo 8 muestras a lo largo del año.

Figura 2.3: mapa de la zona de muestro correspondiente al Arroyo Napostá. ★ Sitios de muestreo estacional (Estrellas amarillas)

Figura 2.4: Sitios de muestreo estacional sobre el Arroyo Napostá.

Aguas de consumo:

El muestreo de estas aguas se realizó de forma aleatoria en distintos puntos de la ciudad. Se colectaron 14 muestras de tanques domiciliarios y 13 muestras de grifos conectados a la red de distribución de agua potable. Para su ubicación, el plano de Bahía Blanca se dividió en cuatro cuadrantes a partir de la Plaza Rivadavia, ubicada en el centro de la ciudad (Fig. 2.5).

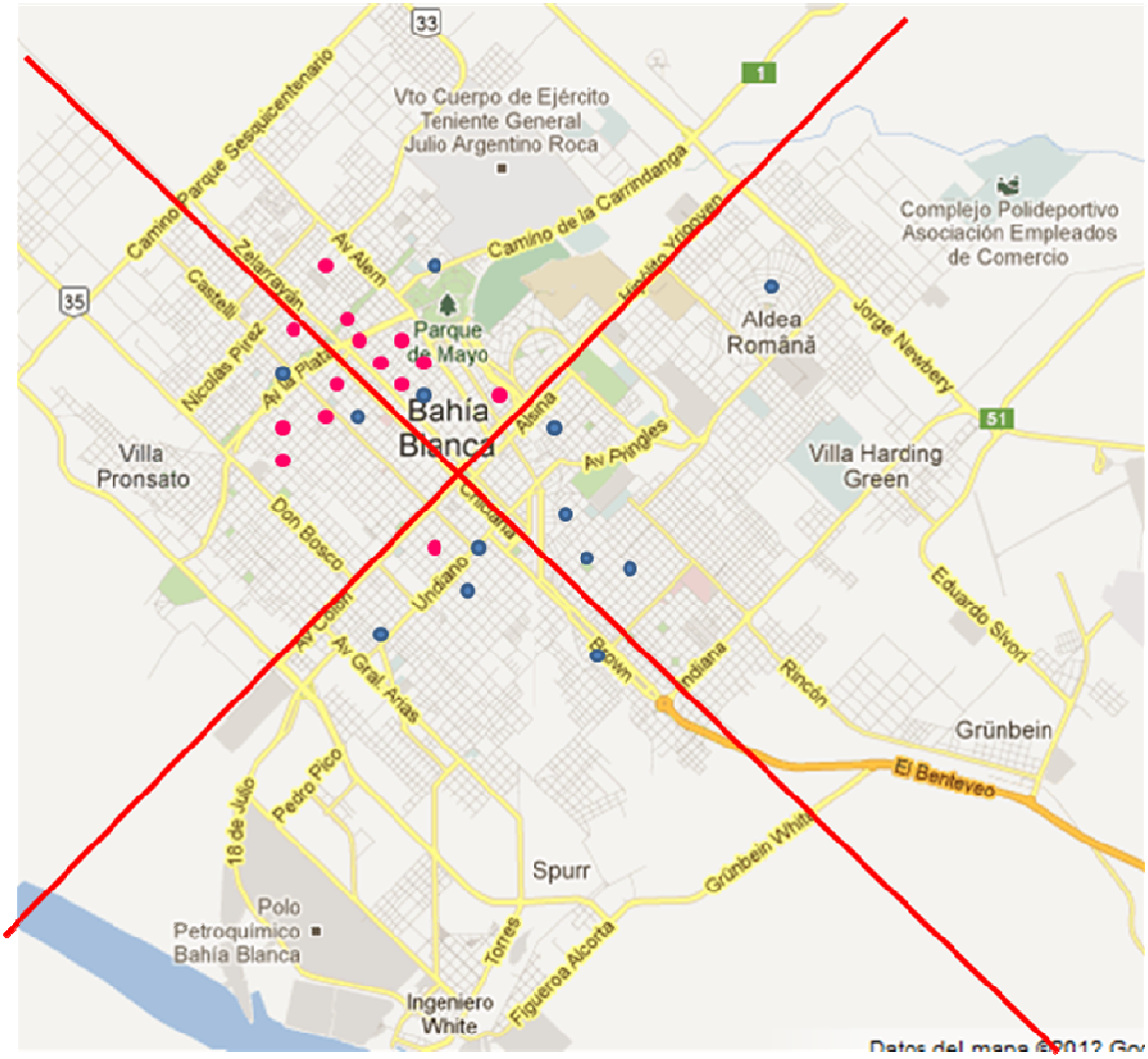


Figura 2.5: Plano de Bahía Blanca mostrando en los cuatro sectores los sitios de muestreo. ● Agua de grifos, conectados a la red de distribución de agua potable. ● Agua de tanques domiciliarios.

En todos los sitios mencionados se recogieron muestras y se procesaron según lo detallado previamente. En el caso de las muestras de piscinas los cultivos se realizaron por duplicado, incubando una de las palcas a 42°C para investigar la presencia de especies termófilas.

En las piscinas, se determinó, además, la calidad bacteriológica del agua, para lo cual se realizó la prueba de Recuento de bacterias herótrofas en Placa (RHP). Se tomó 1 ml de la muestra original y de las diluciones seriadas hasta 1/100 y se sembraron por la técnica de agar volcado en cajas de Petri con agar Plate Count. Se incubaron en estufa a 32°C durante 48 h y se realizó el recuento de colonias desarrolladas como Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ ml.

Procesamiento, siembra y cultivo para aislamiento de AVL.

1.1 Muestras de aguas

Las muestras de agua se recogieron en botellas de vidrio estériles, de boca ancha, o en frascos estériles comerciales utilizados para análisis de orina. Se recolectaron en forma estéril y sin contaminación ambiental.

1.1.a De cuerpos de agua:

Para recolectar las muestras los frascos fueron sumergidos en el agua, aproximadamente a 20 cm de la superficie, se abrió la tapa de los mismos, y una vez llenos se taparon. Todo el procedimiento se realizó bajo el agua, evitando así la contaminación de las muestras con el aire.

1.1.b De grifos:

Se tomaron los recaudos necesarios para la obtención de una muestra bacteriológicamente estéril. Las canillas de donde se tomaton las muestras tuvieron el siguiente tratamiento:

- Se quitaron de la canilla tubos de goma o dispositivos que estuvieran presentes para evitar el salpicado o la contaminación con cualquier elemento extraño. Se limpió la boca de la canilla para sacar la suciedad de la parte interna, después se dejó correr el agua en abundancia durante 2 o 3 minutos, luego se cerró perfectamente la canilla para esterilizarla.
- La canilla se esterilizó flameándola con un hisopo de algodón embebido en alcohol.

- Se abrió la canilla con cuidado y se dejó salir agua durante medio minuto en forma tal que el chorro no fuera intenso. Sosteniendo el frasco estéril se destapó cuidadosamente, evitando todo contacto de los dedos con la boca del frasco, se llenó y se tapó herméticamente.

En los casos en que no pudo flamearse la canilla, esta se abrió y se dejó correr agua por 5 min.

1.1.c. De tanques domiciliarios:

Se sumergió el frasco estéril bajo el nivel de agua, se raspo la pared del tanque con la boca del frasco y se lo tapo bajo el agua.

1.1.d Procesamiento de las muestras de aguas obtenidas:

Una vez recogidas las muestras se llevaron al laboratorio en donde se dejaron reposar entre 18 y 24 h. Transcurrido este periodo se descartó por volcado parte del sobrenadante de la botella o del frasco, reteniendo aproximadamente un volumen de 40 ml. Este volumen remanente se centrifugó, hasta llegar a volumen cero, por periodos de 10 min a 2000 rpm, en tubos plásticos estériles de 15 ml con tapa a rosca. El pellet obtenido de las sucesivas centrifugaciones se utilizó para realizar la observación directa de la muestra y la siembra.

Para la observación directa se colocó una gota del pellet entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio óptico (MO). Se registró como positiva la observación de estructuras compatibles con trofozoítos y quistes de AVL. Para mejorar la visibilidad de los quistes en la observación microscópica directa, se colocó una micro-gota de **tinta china** (comercial, para dibujo) entre el porta y cubre con la muestra, lo que permitía ver los quistes sin teñir, sobre un fondo negro.

1.1.e Siembra:

Para la siembra se utilizaron placas de Petri estériles, descartables, de 6 cm de diámetro con aproximadamente 5 ml de Agar No Nutritivo (ANN) (Ver preparación de ANN: Sección 1.4 Medios de cultivo y soluciones). Una vez que se solidifico el ANN, se colocaron sobre su superficie 500 µl de una suspensión de *Escherichia coli* en Page, y sobre ésta 100 µl de la muestra de agua.

1.3 Cultivo:

Las placas sembradas se colocaron en estufa de cultivo a 37°C. A las 48 h de incubación se realizó la primera observación para evidenciar si hubo o no crecimiento. Para ello se raspó con ansa bacteriológica la superficie del agar, el material extraído se suspendió en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjeto y se observó al microscopio óptico; primero se recorrió con 10X y luego se confirmaron las estructuras sospechosas con 40X.

El cultivo fue considerado positivo cuando se observaron trofozoítos y/o quistes morfológicamente compatibles con AVL. Cuando el resultado fue negativo, la observación se repitió la diariamente durante 7 días. Si a los 15 días de incubación no se observó desarrollo de AVL, se descartó y se registró como negativo.

En las muestras que resultaron positivas se realizó el estudio morfológico y morfométrico de las cepas aisladas. Se registró la formación de acantópodos, seudópodos y las características del núcleo en los trofozoítos aislados. En los quistes se registraron las características de la pared, y el número de ostiolos.

Se midieron con ocular micrométrico los diámetros mayores de por lo menos 60 trofozoítos y 60 quistes, para obtener los tamaños promedio de los mismos.

Para descartar la presencia de especies pertenecientes al género *Naegleria* se realizó la prueba de Transformación Amebo-Flagelar (TAF). Para ello cada muestra positiva se repicó en ANN y a las 48 h de incubación se le agregó 3 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente. A las 2, 4 y 6 horas de incubación se realizaron observaciones en fresco, entre porta y cubre. Con esta prueba, si la AVL aislada corresponde al género *Naegleria,* cambia a la forma flagelada (Fig. 1.3 b), caso contrario se observa sólo la forma ameboide de los trofozoítos (Fig. 1.3 a).

1.4 Medios de cultivo y soluciones:

-ANN (Agar-Agar 1,5% en Solución de Page (p/v)): Para preparar el ANN se pesó en balanza digital 1,5 gr de Agar-Agar Britania (Código B0101405, Lote 230) y se disolvió en 100 ml de Solución de Page (Ver composición más abajo). El medio fue calentado a baño María hasta ebullición, se fraccionó de acuerdo a su uso y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

-*Solución de Page*:
NaCl (Anedra Lote 18476-1)……..120 mg
MgSO4 x 7H2O (Anedra Lote 18440-2)……4 mg
CaCl2 x 2H2O (Anedra Lote 18448-1)……4 mg
Na2HPO4 (Mallinckrodt, 7917)……..142 mg
KH2PO4 (Anedra Lote 18808-88)……..136 mg
H2O destilada csp……..1000 ml

-Cepas de *E. coli*: como se puede utilizar cualquier cepa aislada en Agar Levine, identificadas por su característico brillo metálico, nosotros solicitamos a un laboratorio de

Bacteriología de la ciudad de Bahía Blanca, una cepa tipificada adecuadamente, y con ella se trabajó durante toda la Tesis, realizando repiques semanales. De esta cepa, con un ansa se tomó material que fue suspendido en un tubo con solución de Page estéril con turbidez equivalente a tubo 2 de Mc Farland.

Para perpetuar la cepa se realizaron repiques en Agar nutritivo, que fueron conservados en heladera por periodos de hasta 6 meses.

-Agar nutritivo (Agar sangre base 0,7% en agua destilada (p/v)): para su preparación se pesaron 0,35 g de Agar Sangre base en balanza digital y se disolvieron en 50 ml de agua destilada. El medio se calentó a baño María hasta ebullición, se fraccionó de acuerdo a su uso y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

Resultados:

Piscinas Cubiertas:

En 5 de las 7 piscinas (71%) estudiadas se aislaron AVL en las placas incubadas a 37ºC, al menos en una época del año (Tabla 2.I). Del total de muestras (n: 84) donde se investigó la presencia de AVL, 22 (26%) tuvieron cultivos positivos, las especies halladas en todos los casos se clasificaron morfológicamente como pertenecientes al género *Acanthamoeba*. El examen directo de todas las muestras fue negativo.

Teniendo en cuenta el/los sitios muestreados en las piscinas, los 22 aislamientos de *Acanthamoeba* se repartieron de la siguiente forma: 6 (27 %) del fondo de las piscinas; 8 (36,5 %) de superficie y 8 (36,5 %) de las recolectadas por raspado de pared (Fig. 2.6).

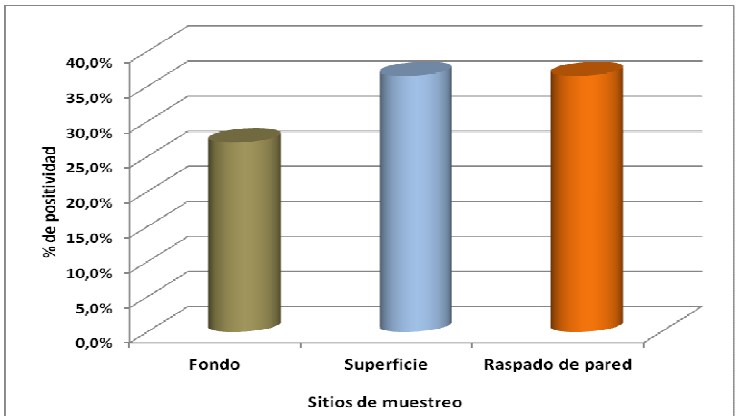


Figura 2.6. Porcentaje de muestras positivas por sitios de muestreo.

Los datos de temperatura ambiental, temperatura del agua, pH, concentración de cloro y RHP se muestran en la Tabla 2.I. La concentración de cloro permitida por reglamento Municipal en las piscinas, es de hasta 2 ppm.

Tabla 2.I. Datos fisicoquímicos y biológicos obtenidos durante el muestreo estacional y aislamientos de Amebas de Vida Libre en piscinas cubiertas de Bahía Blanca. 2007/08.

Piscina Nº	Cloro (ppm)	T Amb (ºC)	T Agua (ºC)	pH	Bacterio-lógico RHP (UFC/ml)	Aislamiento					
						Muestra			TAF	Positivo/ Estaciones del año	Determinación taxonómica
						Fondo	Sup	Pared			
1	1 a 3	20 a 29	32 a 34	6,5 a 7,8	100	+	+	-	-	P - V - I	*Acanthamoeba* spp.
2	1,5 a 3	25 a 32	24 a 34	6 a 7,2	65	+	+	+	-	P - V - I	*Acanthamoeba* spp.
3	1 a 3	24 a 29	30 a 32	6 a 7,2	65	+	+	+	-	P - O	*Acanthamoeba* spp.
4	1,5	22 a 27	36 a 40	7 a 7,8	450	-	-	+	-	I	*Acanthamoeba* spp.
5	1 a 3	22 a 34	25 a 32	7,5 a 8,2	400	+	+	+	-	I - P - O	*Acanthamoeba* spp.
6	0,5a 1,5	24 a 32	33 a 36	6,5 a 7,8	60	-	-	-	-	-	-
7	0,4 a 3	24 a 29	30 a 32	6,5 a 8,2	30	-	-	-	-	-	-

T. Amb: Temperatura Ambiental T. Agua: Temperatura del Agua RHP: Recuento de Heterótrofas en Placa

TAF: Transformación Ameboflagelar; P: Primavera, V: Verano, O: Otoño, I: Invierno

La positividad por estación se muestra en la Fig. 2.7 con 57% de muestras positivas en invierno y primavera, y 29% en otoño y verano.

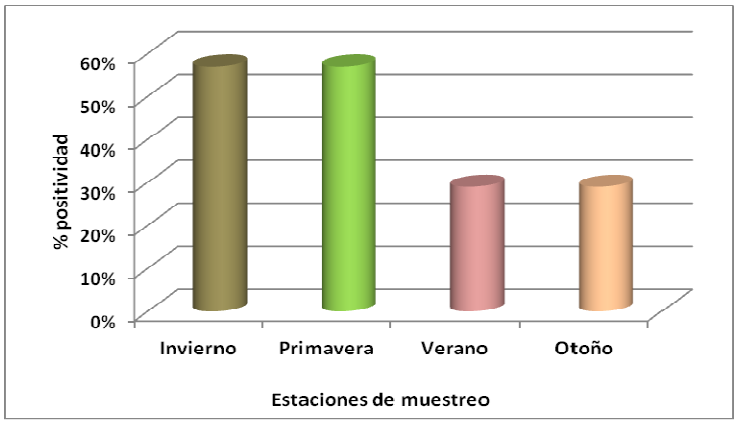


Figura 2.7. Porcentaje de positividad de las muestras por estación.

A los aislamientos se los agrupó por piscina y por estación, ya que las amebas aisladas en cada uno de ellos presentaban las mismas características morfológicas, reduciéndose el número a 12 (Tabla 2.II). En todos los casos las especies halladas se correspondieron morfológicamente con el género *Acanthamoeba*, con trofozoítos de un tamaño variable entre 13,5 µm y 25,5 µm; los quistes presentaron un tamaño entre 6,3 µm y 13,4 µm. En base a sus características, los aislamientos correspondieron: 8 al Grupo II y 4 al Grupo III (Tabla 2.II).

La TAF resultó negativa para todos los casos (Tabla 2.I). Los cultivos incubados a 42°C no mostraron desarrollo.

Tabla 2.II. Aspectos morfológicos de quistes y trofozoítos de los aislamientos obtenidos de piscinas cubiertas.

	Tamaño (µm)		Nº de brazos	Grupo *
Aislamiento	Quistes	Trofozoítos		
1 P	11,4 ± 1,2	17,1 ± 3,8	4-5	II
1 V	12,1 ± 1,6	19,2 ± 4,1	4-5	II
1 I	11,2 ± 1,9	16,7 ± 3,6	4-5	II
2 I	8,0 ± 1,5	13,5 ± 1,8	ausentes	III
2 P	6,3 ± 1,3	15,3 ± 4,7	ausentes	III
2 V	11,2 ± 1,6	18,3 ± 3,4	4-5	II
3 P	10,6 ± 2,4	16,6 ± 4,1	3-5	II
3 O	10,9 ± 1,4	15,1 ± 3,4	3-5	II
4 I	8,1 ± 1,6	15,0 ± 4,8	ausentes	III
5 I	13,4 ± 2,5	25,5 ± 4,8	4-6	II
5 P	10,3 ± 1,5	19,1 ± 4,8	4-6	II
5 O	9,0 ± 1,4	19 ± 2,3	ausentes	III

1 a 5: Número de piscina. I: Invierno. P: Primavera. O: Otoño. V: Verano.
*Según clasificación de Pussard & Pons, 1977

Arroyo Napostá:

En el barrido inicial de 20 muestras recolectadas en un tramo del recorrido del arroyo, se obtuvo el 100% de los cultivos positivos, siendo la observación directa positiva solo en el 45% de las mismas (Gertiser y col., 2008; Gertiser y col., 2009). El muestreo estacional de los sitios seleccionados arrojó resultados idénticos, el 100% de los cultivos fue positivo en todas las estaciones, con un 44% de observaciones directas positivas (Fig. 2.8). En todos los casos los aislamientos hallados, clasificados sólo por microscopía óptica, se ubicaron en el género *Acanthamoeba*. De acuerdo con la clasificación de Pussard & Pons, el 22%

correspondió al Grupo II, y el 78% restante al Grupo III. El tamaño de los trofozoítos osciló entre 10,8 y 18,4 µm de diámetro, mientras que el de los quistes fue de 5,8 a 12,3 µm.

Aguas de consumo:

Se aisló *Acanthamoeba* en el 28,6% de los tanques domiciliarios de agua de consumo (Gertiser y col., 2008; Gertiser y col., 2009), mientras que en las muestras tomadas de grifos conectados en forma directa a la red de distribución de agua potable, sin pasar por el tanque intermediario, no se evidenció presencia del protozoo (Fig. 2.8).

Con referencia a los Grupos hallados, según clasificación de Pussard & Pons, en las muestras de tanques domiciliarios, encontramos que el 50% de las muestras correspondieron al Grupo II y el otro 50% al Grupo III.

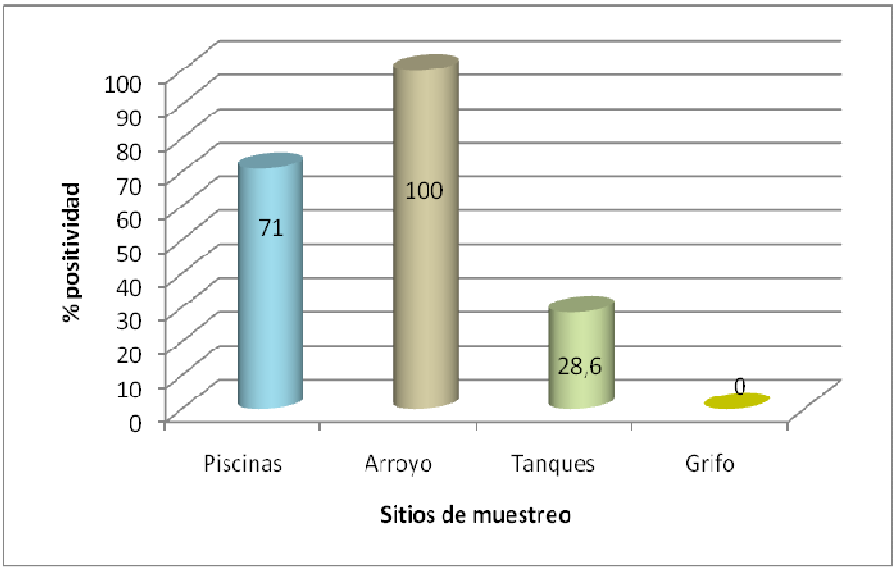


Figura 2.8: Porcentaje de muestras positivas para *Acanthamoeba* según sitios de muestreo, Bahía Blanca, 2007-2010.

En la observación microscópica, de todos los aislamientos mencionados, los trofozoítos mostraron características distintivas. Movimiento lento típicamente ameboide por emisión de seudópodos y finas proyecciones citoplásmicas, los característicos

acantópodos; núcleo refringente y vacuolas de exclusión de agua muy visibles que se contraían y desaparecían intermitentemente (Fig. 2.9). Los quistes presentaron una doble pared, compuesta por una externa, irregular o lisa y gruesa (exoquiste), y otra interna (endoquiste) más fina y lisa, poliédrica o esférica, criterio utilizado para la clasificación del género *Acanthamoeba* en Grupos de Pussard & Pons, 1977 (Fig. 2.10 y 2.11).

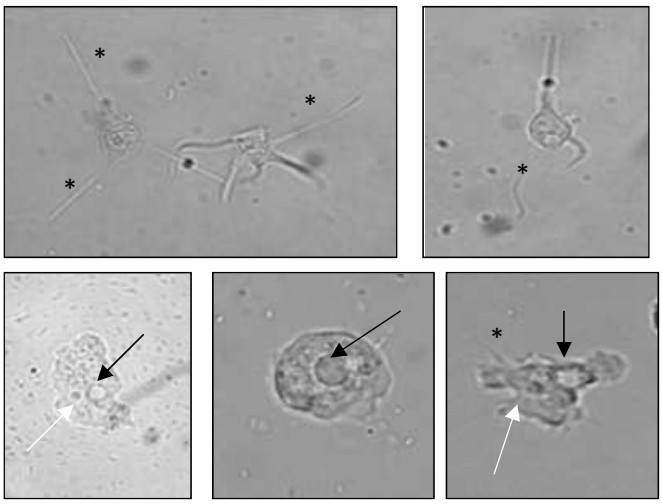


Figura 2.9. Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., en fresco con las características propias del género. * acantópodos, flechas negras: vacuolas de exclusión de agua, flechas blancas: núcleos.

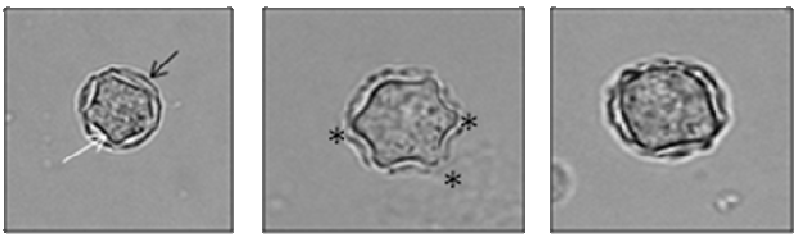


Figura 2.10. Quistes de *Acanthamoeba* spp., Grupo II. Flecha negra: exoquiste; flecha blanca: endoquiste; * Brazos.

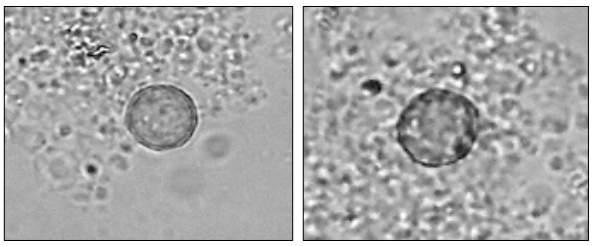


Figura 2.11. Quistes de *Acanthamoeba* spp., Grupo III

La prueba TAF resultó negativa para todos los aislamientos de las fuentes mencionadas.

La observación directa de los sedimentos de las muestras de agua, entre porta y cubreobjetos con y sin tinta china, mostró que la sensibilidad (medida como muestras positivas o negativas detectadas por cada método) no cambió cuando se utilizó uno u otro procedimiento. Sin embargo la impregnación con tinta china facilitó el hallazgo de las AVL. El tiempo necesario para realizar su búsqueda se optimizó enormemente, reduciéndose en un 40% respecto de su no utilización. Con el contraste de la tinta china, las AVL se hallan rápidamente con 10X y luego se confirma su determinación en 40X (Fig. 2.11.1). Por este motivo (tiempo) es que recomendamos su utilización.

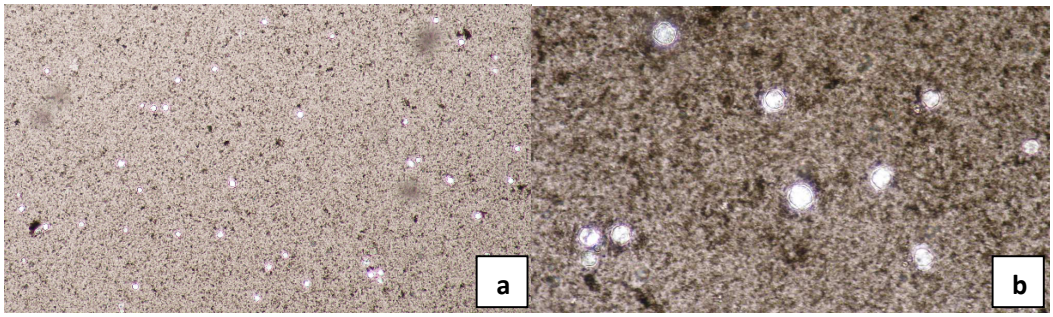


Figura 2.11. 1: Quistes de *Acanthamoeba* teñidos con tinta china. **a**: con 10X, y **b** con 40X

Discusión y conclusiones

Contrariamente a lo señalado en algunas publicaciones (Muñoz y col., 2003; Cermeño y col., 2006) las observaciones microscópicas directas de todas las muestras de las piscinas

resultaron negativas, resaltando la importancia del cultivo en ANN, que brinda las condiciones necesarias para aumentar la sensibilidad del estudio. La sensibilidad de la observación directa para las otras muestras de agua, arroyos, tanques, grifos, no superó el 50%.

Según lo publicado, la incubación de las muestras a 42°C, favorecería el crecimiento de amebas pertenecientes al género *Naegleria,* que son termofílicas, dificultando el desarrollo de otras especies que pudieran estar presentes en la muestra (De Jonckheere y col., 1977). El hecho de que no hubo desarrollo en ningunas de las muestras de piscinas incubadas a esta temperatura y que las pruebas de TAF de todas las aguas estudiadas resultaran negativas, nos permitiría descartar la presencia de este género en las muestras estudiadas.

El crecimiento de *Acanthamoeba* a 37 °C facilitaría su comportamiento como patógeno potencial, ya que demuestra la capacidad de crecimiento a la temperatura corporal humana (Khan y col., 2001). Sin embargo, para demostrar la virulencia de un aislamiento de *Acanthamoeba*, es necesario realizar cultivos celulares y/o inoculación en animales de experimentación.

Del total de **piscinas** estudiadas sólo dos resultaron negativas. En ambas se observaron condiciones distintivas respecto del resto, que eran más antiguas y en las que se realizaba cloración y filtración de agua tradicionales. Una de ellas (piscina 6) poseía un sistema robotizado de cloración y limpieza permanente de las paredes de la pileta, con lo cual se minimizaría el crecimiento de microorganismos que pudieran actuar como sustento para la proliferación de *Acanthamoeba*; además, el agua que abastecía la piscina era tratada por un sistema compuesto por varios filtros ubicados consecutivamente. La otra (piscina 7) había sido refaccionada previamente al inicio del muestreo reemplazándose todo el interior de la misma.

En este caso, el material nuevo de la piscina reduciría la formación de biofilms y consecuentemente la proliferación de amebas. Un biofilm o biopelícula es una población de microbios asociada a una superficie y embebida en una matriz de polímeros extracelulares (Lau y col., 2005). Varios trabajos indican que la formación de biofilms

sobre la superficie de las lentes de contacto aumentaría la afinidad de unión y favorecería el crecimiento de *Acanthamoeba* (Simmons y col., 1998; Tomlinson y col., 2000; Beattie y col., 2003). Si trasladamos estas observaciones a la formación de biofilms sobre las paredes de las piscinas podríamos conjeturar que tendrían un efecto similar.

En concordancia con otros autores (Vesaluoma y col., 1995) no hallamos correlación entre la calidad bacteriológica del agua y el aislamiento de *Acanthamoeba* (Tabla 2.I). Los quistes de *Acanthamoeba* spp. pueden llegar a las piscinas por el aire (Kingston y col., 1969), por el agua que se utiliza para su llenado (Jadin y col., 1972; Hoffmann y col., 2001) o transportados por los bañistas (Rivera y col., 1991). Todas estas fuentes son difíciles de controlar, de manera que investigar la presencia de *Acanthamoeba* y determinar las especies presentes, es relevante para tomar medidas profilácticas tendientes a disminuir los riesgos de infección en los usuarios de piscinas.

La distribución de las AVL en las piscinas no es homogénea dependiendo de numerosos factores tales como la biología del parásito, tipo de recirculación del agua, material utilizado en su construcción, tipos de filtración del agua, métodos de desinfección, frecuencia de bañistas, el tiempo de uso de la piscina, y acúmulo de sustancias orgánicas (Moura, 1980). Como se muestra en la Fig. 2.6, el mayor número de muestras positivas correspondió a la superficie del agua y al raspado de pared. Esto podría deberse a una mayor exposición de la superficie del agua al aire, una de las fuentes de provisión de quistes, y a la formación sobre la pared de biofilms, que sustentarían la adhesión y el crecimiento de *Acanthamoeba* y otros microorganismos (Vesaluoma y col., 1995).

La distribución estacional (Fig. 2.7) muestra que el mayor número de aislamientos positivos se registró en las estaciones de invierno y primavera, lo que coincide, según comunicación de los propietarios de piscinas, con los meses en que concurren la mayor cantidad de bañistas a las mismas. Esto estaría en concordancia con que las personas también son fuente de contaminación de las aguas, ya que es posible que transporten AVL sobre su cuerpo adquiridas por el polvo ambiental (Rivera y col., 1991).

Para las aguas del **Arroyo Napostá,** el elevado porcentaje de aislamientos de AVL, particularmente de especies de *Acanthamoeba*, fue el esperado dada su amplia distribución ambiental. Aguas con un alto contenido de materia orgánica sirven de sustento para su crecimiento, ya sea de forma directa o por permitir el desarrollo de especies que sirven de alimento a las AVL. No se registraron variaciones estacionales en la positividad de los cultivos, probablemente por la resistencia y longevidad de los quistes de *Acanthamoeba* frente a las condiciones extremas.

En las muestras de **agua de consumo** solo se obtuvieron aislamientos de *Acanthamoeba* en las muestras de tanques domiciliarios, lo que resalta la importancia de realizar tareas de mantenimiento y limpieza en forma periódica en estos reservorios, y sobre todo evitar la utilización de estas aguas para la limpieza de las lentes de contacto. Si bien la cloración, utilizada en el tratamiento para la potabilización del agua no es capaz de eliminar los quistes de *Acanthamoeba*, las etapas de filtrado o de sedimentación ayudan a la eliminación de los mismos. Esto sumado a una correcta distribución de la misma, asegura un producto final libre de estos contaminantes.

Todos los aislamientos mencionados, determinados por observaciones al microscopio óptico, correspondieron a amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, un protozoario que presenta una forma quística altamente resistente a la desecación y a las condiciones climáticas extremas. El clima de Bahía Blanca es templado, sub-húmedo, con temperaturas moderadas y alta variabilidad. La ciudad se caracteriza por ser ventosa con flujo predominante de los sectores Norte y Noroeste y velocidades medias de 24 km/h. Este hecho provoca nubes de polvo en suspensión que cubren el centro urbano (Capelli y col., 2006). Con estas características meteorológicas, Bahía Blanca ofrece condiciones ecoepidemiológicas ideales para la dispersión de *Acanthamoeba*.

Aunque parte de este estudio se realizó en piscinas cubiertas, en todos los establecimientos se observaron ventilaciones que daban directamente al ambiente exterior, y que permanecían abiertas gran parte de la jornada para eliminar los vapores

concentrados sobre las piscinas. Para las aguas naturales el elevado porcentaje de aislamientos positivos fue el esperado debido a su amplia distribución ambiental.
Los aislamientos de *Acanthamoeba* de piscinas se correspondieron mayoritariamente con el Grupo II (Pussard y col., 1977). Este grupo es el que se encuentra con mayor frecuencia en el ambiente y en las muestras clínicas (Stothard y col., 1998) y dentro del mismo es posible ubicar especies pertenecientes al genotipo T4 (Walochnik y col., 2000) que incluye los agentes más comunes responsables de QA y EGA (Khan, 2006; Siddiqui y col., 2012). Esto representa un riesgo potencial para los bañistas, principalmente para los usuarios de lentes de contacto o aquellos que presenten una condición inmunodebilitante.
La importancia epidemiológica de las piscinas como fuente no natural de *Acanthamoeba*, consiste en el riesgo potencial de actuar como vehículos para su transmisión al hombre. Debido a la presencia de *Acanthamoeba* spp., en natatorios, y considerando que algunas especies pueden ser patógenas para el hombre, recomendamos una limpieza profunda de los mismos, evitando la acumulación de materia orgánica en las paredes, para minimizar los riesgos de infección.

En las aguas del Arroyo Napostá fue mayoritario el Grupo III, que también incluye especies de patogenicidad demostrada para el hombre, lo cual demuestra la importancia epidemiológica de estas aguas como fuente natural de diseminación de las AVL.

Si bien la eliminación de *Acanthamoeba* en las aguas recreacionales resulta muy difícil por tratarse de un microorganismo ubicuo y sumamente resistente a los desinfectantes utilizados comúnmente en el tratamiento de las aguas, consideramos oportuno informar a las personas en riesgo y a las autoridades sanitarias de la ciudad y zona, de los peligros que representa la exposición a aguas potencialmente contaminadas.

2.1.2 AVL en otras regiones de la República Argentina

Objetivo:

El objetivo de esta sección fue trazar el mapa epidemiológico de las AVL en nuestro país. Para tal fin, se efectuó la búsqueda de las mismas en diferentes regiones de la República Argentina:

I. Se realizaron muestreos periódicos en la localidad de Sarmiento y el curso inferior del Río Senguer, Provincia del Chubut, en el marco del proyecto "Presencia de los parásitos *Acanthamoeba, Naegleria, Hartmanella; Cryptosporidium, Toxocara y Echinococcus* en el medio ambiente acuático de la Provincia del Chubut: ecoepidemiología e importancia sanitaria ", desarrollado conjuntamente por la Cátedra de Parasitología Clínica, UNS y por el Departamento de Zoonosis, Dirección de Patologías Prevalentes y Epidemiología. Secretaría de Salud. Provincia del Chubut. Subsidiado por el Departamento de Investigación de la Secretaría de Salud del Chubut.

II. Se realizó el muestreo estacional de los balnearios ubicados sobre el Río Sauce Grande, en el trayecto que pertenece a la localidad Bonaerense de Sierra de la Ventana.

III. Se obtuvieron y analizaron muestras aleatorias de aguas naturales y de grifos de las provincias de: Salta, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santiago del Estero, Córdoba, Mendoza, Santa Fe, Neuquén y Río Negro.

I. Búsqueda de AVL en aguas de la ciudad de Sarmiento, Chubut.

Introducción:

La ciudad de Sarmiento, ubicada en la provincia de Chubut, Argentina, es un pequeño oasis enclavado en el centro de la meseta patagónica. Se emplaza a 145 Km de la ciudad de Comodoro Rivadavia, en latitud 45° 35' S y longitud 69° 05' W. El valle, enmarcado por los lagos Musters y Colhue Huapi, se encuentra a 268 m sobre el nivel del mar. Comprende 42.000 ha aproximadamente. Se riegan unas 6455 ha, de las cuales un 36 % se encuentra sistematizado (2323,8 ha) por medio de canales de riego que las atraviesan. El clima es seco, templado-frío, con días largos en el verano (17 h de luz) y cortos en el invierno (9 h de luz). Las temperaturas medias son, para el mes más caluroso (enero) de 17,8°C y para el mes más frío (julio) de 4,1°C; siendo la media anual de aproximadamente 10,5°C. Las precipitaciones anuales están en el orden de los 155 mm, produciéndose las mismas principalmente en los meses de otoño-invierno. La velocidad media del viento oscila entre 8 y 30 km/hora, registrándose los valores más altos en los meses primaverales. La dirección de los mismos es fundamentalmente O-NO y con menor frecuencia S-SO. La humedad media mensual es alta en invierno, del orden de 75 a 80 %, siendo muy baja el resto del año (40% en verano) (http://www.sarmientochubut.gov.ar).
En los meses cálidos, sus lagos, ríos y algunos de los canales destinados para riego, se utilizan como aguas recreacionales. Estas características, sumadas a los vientos frecuentes en el lugar, uno de los principales vehículos de diseminación de los quistes de AVL en el ambiente, hicieron que Sarmiento fuera un lugar adecuado para estudiar la Ecoepidemiología de las AVL en la región.

Materiales y métodos:

El Área de muestreo (Fig. 2.12) corresponde al curso inferior del Rio Senguer. En la región señalada se realizaron muestreos estacionales; otoño, invierno, primavera y verano en el periodo 2009-2011.

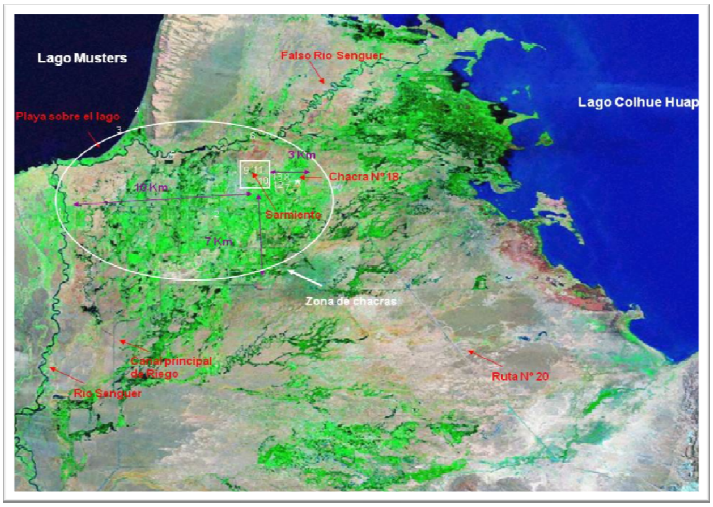


Figura 2.12: Área de muestreo.

Muestreo: Los sitios muestreados en el período abril 2009 - marzo 2011 fueron: Lago Muster (LM), Río Senguer (RS), cuerpos de aguas naturales ubicados en los cuatro puntos cardinales que rodean el valle y canales de riego de las chacras.

Del sistema de potabilización de agua se recogieron muestras de la Pileta Desarenadora (PD), una de la superficie, una del fondo y otra de raspado de la pared, y en la planta potabilizadora se tomaron muestras de la pileta ubicada en la entrada de la planta. Todas las aguas mencionadas se agruparon como Aguas a Cielo Abierto (ACA) (Fig. 2.13). De la única piscina cubierta de la localidad se recolectaron muestras del fondo, raspado de pared y superficie de la misma, identificadas como Aguas Cubiertas (AC).

Se muestrearon aguas de canillas y de tanques domiciliarios, de la entrada y salida de agua del tanque de la Guarnición Militar Sarmiento perteneciente al Ejército Argentino y de la salida de agua de la planta potabilizadora hacia la red de distribución. Todas éstas bajo el nombre de Aguas Entubadas (AE), es decir con circulación por cañerías. Se recolectó, también, Agua de Pozo (AP) utilizada para consumo.

Figura 2.13: Muestreo de aguas a cielo abierto (ACA), **a**: Canal de riego, **b**: Rio Senguer, **c**: Pileta desarenadora y **d**: Lago Muster.

Cada uno de los sitios de muestreo fue geo-referenciado, registrando latitud, longitud y altura sobre el nivel del mar. Al momento de realizar la toma de muestra se registraron para cada lugar, la temperatura del agua y la del ambiente (Tabla 2.III).

Tabla 2.III: Datos geográficos y temperaturas de los sitios muestreados en Sarmiento, Chubut, Argentina

Tipo de agua	Lugar	Long/Lat	Asnm m	T agua °C*	T ambiente °C*
ACA	Lago Muster	S 45°34´252´´ WO 69°09 414	281	3,2-18,7	2,6-25,7
ACA	PD Sup	S 45° 32´843´´ WO 69° 07 666	288	14,9-25,0	25,5-30,0
ACA	PD Medio	S 45° 32´843´´ WO 69° 07 666	288	21,6-24,4	4,2-21,4
ACA	PD Final	S 45° 32´843´´ WO 69° 07 666	288		
ACA	Punto Sur	S 45° 42´205´´ WO 69° 04 623	282		
ACA	Punto Oeste	S 45° 36´582´´ WO 69° 14 803	291	15,1-25,4	4,5-21,2
ACA	Pte Abait (RS)	S 45° 35´869´´ WO 69°11 020	279	3,3-25,3	4,6-24,8
ACA	Punto Norte	S 45° 31´770´´ WO 69° 03 806	263	16,8-21,2	5,0-21,2
AC	Piscina (PC) Sup	S 45° 35´702´´ WO 69° 03 764	270	25,5-30,0	26,7-30,0
AC	PC Raspado pared	S 45° 35´702´´ WO 69° 03 764	270	20,9-23,9	5,2-22,7
AC	PC Fondo	S 45° 35´702´´ WO 69° 03 764	270		
ACA	Punto Este	S 45° 43´226´´ WO 68° 51 546	264		
AE	Chacra 18 canilla(C)	S 45° 35´494	262	8,5-13,6	5,5-20,0

		WO 69° 01 401			
AP	Chacra 18 Pozo (P)	S 45° 35´494 WO 69° 01 401	262	8,7-14,7	10,0-19,0
ACA	Chacra 20Canal(CR)	*S* 45º 35 515 WO 69º 02 604	275	4,5-18,2	4,1-19,6
AE	Chacra 20 canilla(C)	S 45º 35 441 WO 69º 02 283	266	12,2-13,1	5,0-18,2
AP	Chacra 20 Pozo (P)	S 45° 35´441´´ WO 69° 02 283	266	6,5-10,9	5,5-18,0
ACA	Drenaje (CR)			4,5-17,8	4,1-20,0
ACA	Planta potab. entrada	S 45° 34´844´´ WO 68° 04 462	284	16,6-30,1	13,0-25,3
ACA	Planta potab. salida	S 45° 34´844´´ WO 68° 04 462	284	17,5-21,5	20,0-25,0
AE	Casa 1. Grifo	S 45° 35´700´´ WO 69° 02 762	274		
AE	Casa 2. Grifo	S 45° 34´844´´ WO 68° 04 462	282	17,0-20,0	21,0-23,0
AE	Guarnición salida tanque	S 45° 35´169´´ WO 69° 00 169	268	15,0-26,5	4,5-20,0
AE	Guarnición entrada tanque	S 45° 35´169´´ WO 69° 00 169	268	17,0-28,3	4,0-20,0
AE	Casa 1. Tanque	S 45° 35´700´´ WO 69° 02 762	274	18,0-22,0	5,0-21,2

Asnm: altura sobre el nivel del mar, en metros. T agua C: temperatura del agua en C°. T ambiente C: temperatura el agua en C°. *temperaturas minimas y máximas registradas durante los muestreos en cada sitio entre 2009-2011.

Resultados:

Se recolectaron un total de 126 muestras. De los sitios muestreados, en diferentes oportunidades, se obtuvieron 91 (71%) cultivos positivos para el aislamiento de AVL, con

solo 39 (43%) observaciones directas positivas. La positividad de los cultivos por tipo de agua analizada se muestra en la Tabla 2.IV.

Tabla 2.IV: Positividad de los cultivos por tipo de agua analizada.

Tipos de aguas	N° de muestras	% de cultivos positivos
ACA	70	91.2
AE	34	53.0
AC	11	15.4
AP	11	72.3

De los 91 aislamientos de AVL, 89 cepas se clasificaron morfológicamente como pertenecientes al género *Acanthamoeba*. Con trofozoítos de 6,3 a 21,8 µm de diámetro y quistes de 4.0 a 14.3 µm de diámetro (Fig. 2.14; a y b).

De las cepas de *Acanthamoeba* aisladas, clasificadas por microscopía óptica, 19 corresponden al Grupo II con quistes de 3 a 5 brazos (Fig. 2.14, c). Del resto, 66 se concentraron en el Grupo III, con quistes esféricos (Fig. 2.14, d) y los 4 restantes presentaban población mixta de quistes, clasificados según Pussard & Pons (1977). La prueba de TAF resultó negativa para todos los aislamientos.

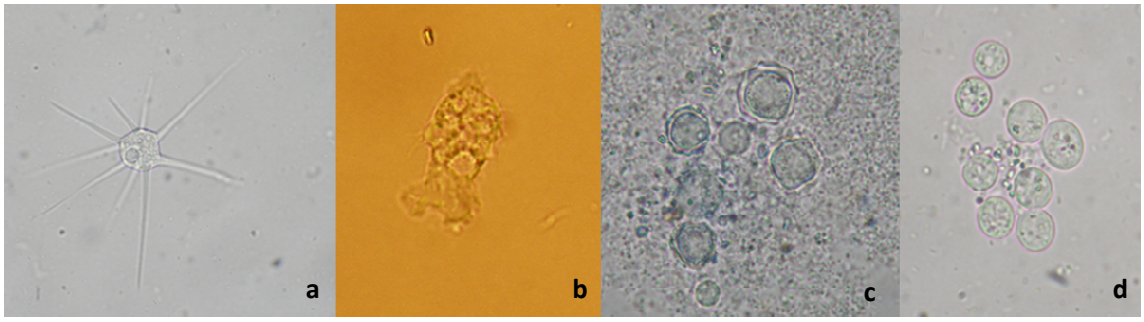


Figura 2.14: **a** y **b**: trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., **c**: quistes pertenecientes al Grupo II, **d**: quistes pertenecientes al Grupo III según Pussard & Pons (1977).

Las cepas restantes (n=2), aisladas del mismo sitio (piscina) en diferentes etapas del muestreo, no se correspondieron morfológicamente con el género *Acanthamoeba*, ya que los trofozoítos no presentaban acantópodos, el numero de núcleos variaba entre 1-2 y su tamaño era de 32,0 ±3,5 µm. Por otra parte la prueba TAF resultó negativa descartando que pertenecieran al género *Naegleria*. Debido a lo expuesto denominamos a esta cepa como No A no N, reflejando que no se trata ni de *Acanthamoeba* ni de *Naegleria* (Fig. 2.15) y a ella se hará referencia en el Capítulo 7 de la presente Tesis.

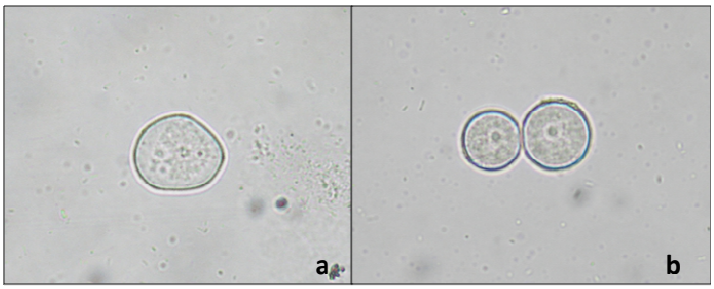


Figura 2.15: **a**. trofozoítos de la cepa denominada No A no N, **b**: quistes.

Discusión y conclusiones:

Nuestros resultados son concordantes con el hecho de que las AVL presentan una amplia distribución ambiental, que queda demostrada, principalmente, por el alto porcentaje de hallazgo de las mismas en aguas a cielo abierto. Por otra parte, los aislamientos positivos de aguas en un amplio rango de temperaturas, algunas muy bajas, destacan la capacidad de adaptación de estos microorganismos a condiciones ambientales variables y adversas.

En las AC, obtenidas de la piscina cubierta de la localidad, solo uno de los sitios de muestreo resultó positivo, aislándose en dos oportunidades solo la cepa denominada No A No N.

Las muestras de agua de red domiciliaria resultaron positivas, aislándose especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*, sin embargo los resultados obtenidos en las muestras de agua de la Planta potabilizadora fueron negativos. Esto indicaría que la

contaminación con estos protozoos se estaría produciendo en el trayecto de distribución a la población.

Otro resultado que merece atención es el del muestreo del tanque perteneciente a la Guarnición Militar Sarmiento. El muestreo del agua que ingresa al tanque resultó negativo, mientras que el análisis del agua que sale del tanque, luego de su almacenamiento en el mismo, fue positivo, lo que permite inferir que la contaminación se produjo en el mismo. Este hecho, acompañado del hallazgo de AVL en tanques domiciliarios, resalta la importancia del buen mantenimiento de estos reservorios de agua, principalmente la realización de la limpieza periódica de sus paredes para evitar la formación de biofilms que sustentan el crecimiento de AVL y otros microorganismos.

Creemos oportuno mencionar que si bien las especies aisladas son potencialmente patógenas, la mayoría de los individuos desarrollan protección inmunológica contra sus infecciones. No obstante, la población en riesgo: inmunosuprimidos, usuarios de lentes de contacto o individuos con lesiones oculares, debe tener presente las medidas preventivas y los riesgos a los que está expuesta.

II. Búsqueda de AVL en el Río Sauce Grande, Sierra de la Ventana, Provincia de Buenos Aires.

Intruducción:

Sierra de la Ventana está ubicada en el Partido de Tornquist, situado al Sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, a los 38º 08' de latitud sur y 61º 47' de longitud oeste de Greenwich. El clima es de tipo templado con temperaturas cercanas a los 20º C, en verano, con una máxima de 40º C, y una mínima absoluta en invierno de -10 º C. Se producen heladas y ocasionalmente algunas nevadas. La temperatura media anual es de 14º C. y las precipitaciones anuales varían entre 500 y 800 mm, siendo la mayoría generalmente en primavera, fines del verano y principios del otoño (Fig. 2.16) (http://www.tornquist.gov.ar).

El **Río Sauce Grande** nace a 500 msnm en el sistema serrano de Ventania y es el principal afluente del dique "Paso de las Piedras", que constituye el reservorio de agua para consumo humano más importante en la zona de influencia (López Cazorla, 2010). Recoge las aguas de las sierras de Curá Malal, Ventana y De Las Tunas. Nace en la Sierra de La Ventana, con un caudal importante en época de lluvias, y pasa por la localidad de Sierra de la Ventana, Villa Arcadia y Saldungaray antes de desembocar en el espejo de agua que forma el dique de Paso de Las Piedras (Aduriz y col., 2003).

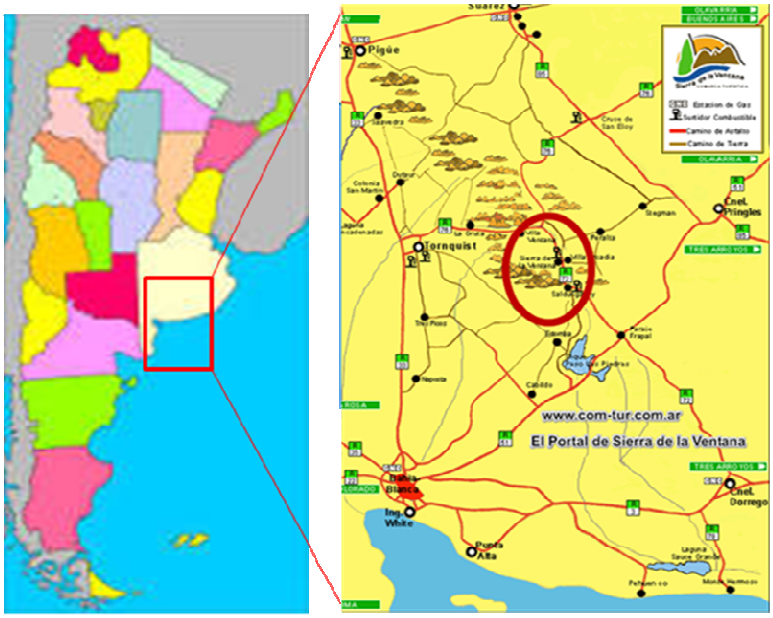


Figura 2.16: Mapa de la provincia de Buenos Aires, Argentina, resaltando la ubicación de Sierra de la Ventana.

La localidad de Sierra de la Ventana se encuentra bordeando el Río Sauce Grande y se abastece de sus aguas, con varios fines: riego, bebederos de animales, y recreación con la práctica de deportes acuáticos y zonas utilizadas como balnearios. Se realizó el muestreo estacional de tres balnearios, denominados: La Hoya, El Dique y Los Angelitos (Fig. 2.17 y 2.18).

Figura 2.17: Mapa de Sierra de la Ventana mostrando la ubicación de los balnearios muestreados.

Figura 2.18: Balnearios muestreados sobre el Río Sauce Grande: **a**: La Hoya, **b**: El Dique, **c**: Los Angelitos

Materiales y Métodos:

Se realizó un muestreo estacional para cada uno de los sitios indicados. Las muestras se recogieron y procesaron como se indicó.

Se analizaron un total de 12 muestras de agua, por duplicado, una por cada estación en cada balneario.

Una vez procesadas las muestras se realizó la observación directa de las mismas para estudios morfométricos y morfológicos.

Resultados:

Todas las muestras resultaron positivas por observación microscópica directa, resultado que se repitió en los cultivos, con un 100% de positividad para el aislamiento de AVL.

Según el análisis morfológico y morfométrico de las cepas aisladas, todas pertenecieron al género *Acanthamoeba*. Los trofozoítos presentaron un tamaño variable de 7,5 a 25 µm de diámetro, con acantópodos, núcleo único y numerosas vacuolas de exclusión de agua. En cuanto a los quistes hubo predominio del Grupo III, 83% de los aislamientos, con quistes lisos, esféricos de 5 a 15 µm de diámetro, mientras que el 17% restante, perteneciente al Grupo II, mostró quistes poliédricos, con exoquiste ondulado, con un diámetro que osciló entre 7,5 a 12,5 µm, y de 3 a 5 brazos.

Discusión y conclusiones:

El hecho de que el 100% de las muestras hayan sido positivas para el aislamiento de AVL, y que todas ellas correspondan al género *Acanthamoeba* refuerza la descripción de este género como ubicuista. Los aislamientos positivos para todas las estaciones del año analizadas demuestran su resistencia a los cambios ambientales, ya que en esta zona los inviernos y veranos son bien marcados con una amplitud térmica importante entre ellos.

En el Río Sauce Grande se aislaron mayoritariamente especies correspondientes al Grupo III, lo que coincide con nuestros resultados en otras aguas naturales analizadas. Recordemos que los Grupos II y III, ambos aislados en estas aguas, revisten importancia epidemiológica ya que albergan especies patógenas para el hombre y los animales.

Si bien nuestros resultados son los esperados por tratarse de fuentes de aguas naturales, con una marcada contaminación orgánica que soporta el crecimiento de las AVL y otros microorganismos, la información sobre la presencia de estos protozoos en aguas de recreación reviste de importancia epidemiológica, ya que éstas actúan como fuente de diseminación. Creemos importante que se informe a la población, sobre todo individuos en riesgo: usuarios de lentes de contacto e inmunodeprimidos, sobre las medidas de prevención necesarias ante la utilización de estas aguas.

III. Búsqueda de AVL en diferentes provincias de la Republica Argentina

Introducción:

Con el objetivo de conocer la distribución geográfica de las AVL en nuestro país, se procedió a realizar muestreos aleatorios en diferentes regiones y provincias. Las muestras, una de cada sitio, se recogieron de fuentes de aguas naturales como ríos, lagunas y lagos, y en algunos casos de grifos conectados a la red de distribución de agua potable (Tabla 2.V).

Tabla 2.V: Provincias muestreadas y sitios de muestro.

Provincia	Muestra	Provincia	Muestra
Salta	Rio Arenales	**Mendoza**	Río Atuel
	Grifo	**Mendoza**	Canal de riego
Misiones	Rio Uruguay	**Santa Fe**	Rio Paraná
Corrientes	Río Aguapey	**Santa Fe**	Arroyo "La Blanqueada"
Entre Ríos	Arroyo Paso de las lagunas	**Neuquén**	Río Malleo
Santiago del Estero	Grifo	**Neuquén**	Lago Chime
	Aljibes		Grifo
	Piscina	**Rio Negro**	Grifo
Córdoba	Grifo		

Resultados:

Las muestras de grifo de las provincias de Salta, Córdoba y Río Negro fueron negativas para el aislamiento de AVL. Las muestras de agua de red que evidenciaron crecimiento fueron las correspondientes a las de la provincia de Neuquén y de Santiago del Estero, siendo las cepas aisladas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, Grupo III (Tabla 2.V a).

Tabla 2.V a: Provincias muestreadas, sitios de muestro, resultado del cultivo, características morfométricas de trofozoítos y quistes, y clasificación grupal según Pussard & Pons, 1977.

Provincia	Muestra	n	Cultivo	Trofozoítos	Quistes	Grupo
Salta	Rio Arenales	1	**Positivo**	18,5 ± 3,3	11,2 ± 1,3	II
	Grifo	1	Negativo			
Misiones	Rio Uruguay	1	**Positivo**	13,0±2,5	7,5±1,5	III
Corrientes	Río Aguapey	1	**Positivo**	15,5±2,8	10,5±1,3	III
Entre Ríos	Arroyo Paso de las lagunas	1	**Positivo**	16,5±3,7	10,2±1,8	II
Santiago del Estero	Grifo	1	**Positivo**	16,6 ± 1,3	8,3 ± 1,3	III
	Aljibes	1	**Positivo**	17,0 ± 1,8	8,0 ± 1,3	III
	Piscina	1	**Positivo**	18,7 ± 1,0	8,5 ± 1,3	III
Córdoba	***Grifo***	1	Negativo			
Mendoza	Río Atuel	1	**Positivo**	13,8 ± 4,3	9,5 ± 1,5	III
	Canal de riego	1	**Positivo**	19,8 ± 4,0	11,3 ± 1,3	II
Santa Fe	Rio Paraná	1	**Positivo**	18,3 ± 4,3	10,6 ± 1,0	III
	Arroyo "La Blanqueada"	1	**Positivo**	14,0 ± 2,3	11,8 ± 1,5	II
Neuquén	***Río Malleo***	1	Negativo			
	Lago Chime	1	**Positivo**	14, 7 ± 3,2	10,8 ± 1,3	III
	Grifo	1	**Positivo**	13, 5 ± 2,8	7,5 ± 1,8	III
Rio Negro	***Grifo***	1	Negativo			

Los cultivos de las muestras de fuentes de aguas naturales, ríos, arroyos, lagos y lagunas, de todas las provincias, exceptuando el Lago Malleo de la provincia del Neuquén, fueron

positivos para el aislamiento de AVL. Así como las muestras de aljibes y de la piscina de la ciudad de Quimilí, en Santiago del Estero (Tabla 2.V a).

En todos los casos las especies aisladas correspondieron al género *Acanthamoeba*, observándose trofozoítos típicos de 13,0 a 19,8 µm de diámetro. Los quistes presentaron un diámetro de entre 7,5 a 11,3 µm, siendo mayoritarias las cepas pertenecientes al Grupo III de Poussard y Pons, lo que concuerda con otros aislamientos ambientales. Las especies de Grupo II mostraron quistes con 3 a 5 brazos.

La ubicación genérica de todos los aislamientos, pertenecientes al género *Acanthamoeba*, mencionados a lo largo de este capítulo, se confirmó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chaing Reacction) utilizando el par de primers JDP1/JDP2 específicos para este género (Schroeder y col., 2001). Los detalles metodológicos y los resultados obtenidos se muestran en el Capítulo 6.

Discusión y conclusiones:

Estos resultados muestran la amplia distribución de este género a lo largo y a lo ancho de la Argentina. Si bien estos muestreos fueron aleatorios, y representan un porcentaje muy pequeño de las fuentes de aguas naturales en cada provincia y en nuestro país, nos permite tener una idea de la presencia de estos protozoos en aguas en Argentina. Al igual que en los otros sitios analizados los resultados fueron los esperados, 76% de muestras positivas para *Acanthamoeba*, confirmando a éste como el género de mayor distribución ambiental.

Comentarios generales de Capítulo 2: Búsqueda y aislamientos de Amebas de Vida Libre (AVL)

Se analizaron 274 muestras de aguas de diferentes fuentes que se clasificaron en **aguas tratadas** (cloradas: tanques, grifos, piscinas, etc) y **aguas naturales** (ríos, lagos, canales, arroyos, etc.). Dentro de esta clasificación, sólo el 30% de las aguas tratadas analizadas

fueron positivas para el aislamiento de AVL, mientras que dentro de las aguas naturales se obtuvo un 92,6% de positividad por cultivo en ANN.

Del total de estos aislamientos, el 98,7% correspondió al género *Acanthamoeba*, tanto por clasificación morfológica como por métodos moleculares (ver cap. 6); mientras que 1,3% restante correspondió a la cepa denominada No A, no N; sin ubicación genérica hasta el momento.

Los estudios realizados sobre el aislamiento denominado "No A no N" se detallan en el Capítulo 7.

Esta diferencia entre aguas tratadas y naturales en el aislamiento de amebas puede deberse a que si bien el cloro no es efectivo en la eliminación de *Acanthamoeba* (De Jonckheere y col., 1976; Derreumaux y col., 1974; Gertiser y col., 2009) sí lo es para limitar el crecimiento de otros microorganismos que le sirven de alimento, controlando o impidiendo así, de manera indirecta, el desarrollo de trofozoítos de esta ameba. En el mundo, *Acanthamoeba* y otros géneros, se han aislado de numerosas fuentes ambientales utilizando la técnica del cultivo en ANN con una suspensión de bacterias, publicada por Page en 1967.

Naegleria se aisló de aguas y tierras en Australia, de canales de agua de torres de enfriamiento en Bélgica y de lagos en Florida. Del sedimento de aguas cloacales en India se aislaron los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, así como de manantiales de aguas cálidas de Nueva Zelanda (Stevens y col., 1977; Behets y col., 2007; Shoff y col, 2008).

En Polonia se analizó el agua de 13 piscinas, 10 cubiertas y 3 a cielo abierto, resultando en un total de 72 muestras. Se obtuvieron 43 muestras positivas, siendo 100% de ellas correspondientes al género *Acanthamoeba,* 5 de las cuales fueron patógenas en ratones (Gornik y col., 2004).

En las Islas Canarias, España, analizaron 114 muestras de tierra y 50 de arena de playa, obteniendo 43 y 21 muestras, respectivamente, positivas para *Acanthamoeba* clasificadas morfológica y molecularmente. Además aislaron éste género en agua de canilla y de acequias de la región (Lorenzo-Morales y col., 2005).

En Brasil se aislaron especies de *Acanthamoeba* y *Naegleria* de acueductos, agua de red de distribución pública y del lodo de piscinas. También se aislaron estos géneros en el 100% y el 3,8% respectivamente, de las muestras de polvo recogidas de dos hospitales de la ciudad de San Pablo (Salazar y col., 1982; Silva y col., 2003). En este país, además, se realizó la búsqueda de AVL en aguas minerales envasadas destinadas al consumo humano, de las cuales se aislaron los géneros *Vahlkamphia, Gloeseria, Acanthamoeba, Filamoeba, Amoeba, Platyamoeba* y *Hartmanella* (Salazar y col., 1982).

En Chile en 1993 se realizaron muestreos de aguas dulces naturales en sectores urbanos, semiurbanos y rurales, siendo el 92% de las muestras positivas para AVL. El 31% de los aislamientos correspondieron a *Acanthamoeba* y el 7,6% a *Naegleria*, ambas consideradas por los autores como potencialmente patógenas para el hombre. Posteriormente se realizó el muestreo de 8 piscinas públicas de la ciudad de Santiago, siendo 5 de estas positivas para el aislamiento de AVL. Las 22 cepas aisladas se repartieron entre los géneros *Hartmanella* (8), *Vanella* (6), *Naegleria* (5) y *Acanthamoeba* (3), resaltando la importancia de las piscinas como fuentes no naturales de contaminación con estos protozoos (Muñoz y col., 1993; Muñoz y col., 2003).

En Venezuela, a raíz del primer caso registrado de MAP en ese país, se realizó un estudio epidemiológico, muestreando aguas de ríos y sus afluentes, obteniendo un 44,4% de las muestras positivas para *Naegleria* (Cermeño y col., 2006).

En Perú se obtuvo un 35,5% de muestras positivas para *Acanthamoeba* de 31 muestras de aguas naturales y artificiales de la ciudad de Ica. El 10% resultaron patógenas para ratones. En Piura, en muestras de ríos, piscinas, tanques y tierras se obtuvo un 100% de aislamientos positivos para *Acanthamoeba* (Instituto Nacional de Salud 1996; Suárez y col., 2002).

Como vemos, nuestros resultados no difieren de los del resto del mundo. A diferencia de Chile, Brasil y Venezuela, en nuestro Laboratorio hemos aislado únicamente especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*, y no hemos tenido hasta la fecha ningún aislamiento perteneciente al género *Naegleria*. Esto probablemente se deba a la ubicación geográfica de nuestra región, de los lugares de muestreo y tipos de aguas analizadas, en la

que no predominan las áreas cálidas en las que *Naegleria* puede crecer y permanecer y al hecho de que este género es sensible a la cloración pudiendo ser eliminado de las fuentes de agua por este desinfectante (De Jonckheere y col., 1976).

Dentro de las aguas tratadas analizadas, las aguas de piscinas fueron las que presentaron mayor prevalencia de *Acanthamoeba* spp, resaltando su importancia como fuente no natural de diseminación e infección.

En las piscinas, las fuentes de contaminación que provienen tanto del aire como de los bañistas y la posibilidad de mayor concentración de materia orgánica respecto al resto de las aguas tratadas, serían los factores que favorecerían la presencia de AVL en sus aguas.

Por lo expuesto, coincidimos en que las AVL son totalmente ubicuistas, aislándose, en este caso, de todas las fuentes de aguas analizadas; y que con la metodología de aislamiento empleada, *Acanthamoeba* es el género predominante en el Sudoeste Bonaerense, en la localidad de Sarmiento, Chubut, y en las provincias cuyas aguas fueron analizadas.

2.2. Casos clínicos de Queratitis acanthamoebiana (QA) en Bahía Blanca

Como comentamos anteriormente los protozoos del género *Acanthamoeba* son extremadamente ubicuos y con capacidad para vivir en una gran diversidad de ambientes.

En individuos, aún inmunocompetentes, algunas especies de *Acanthamoeba* provocan Queratitis Amebiana (QA), una infección de la córnea muy dolorosa, generalmente unilateral, y con compromiso importante de la visión (Marciano-Cabral y col., 2003).

Introducción:

El primer caso de QA fue comunicado por Nagington y col., en 1972 y durante más de una década fue considerada una patología de baja incidencia, hasta que el número de casos comenzó a aumentar conforme se incrementaba el uso de lentes de contacto. Más del 80% de los casos de QA se han presentado en pacientes que utilizaban lentes de contacto blandas o semiblandas (Niederkorn y col., 1999). El principal factor de riesgo para esta patología es el manejo inadecuado de las lentes: su uso durante períodos prolongados, una mala higiene de las mismas y de sus estuches, o bien su lavado con agua de red, con desinfectantes a base de cloro, con soluciones caseras preparadas con agua corriente o con soluciones comerciales almacenadas de manera inadecuada (Niederkorn y col., 1999). Otros factores que aumentan el riesgo de infección son la práctica de deportes acuáticos con las lentes puestas, el lavado de los ojos con agua de red o la presencia de lesiones corneales leves producidas por cuerpos extraños, comunes en soldadores y jardineros (Auran y col., 1987; Sharma y col., 1990; Niederkorn y col., 1999; Latapie y col., 2003).
El daño corneal es un requisito importante para que se produzca la infección, ya que el epitelio lesionado expone glucoproteínas y glucolípidos ricos en manosa, que sirven de anclaje para los trofozoítos de *Acanthamoeba* (Niederkorn y col., 1999). Los quistes son menos sensibles a la acción de las drogas y pueden permanecer durante mucho tiempo en

el estroma corneal siendo los responsables de las recurrencias de la QA (Martínez y col., 1997).

El proceso infeccioso se inicia cuando los trofozoítos entran en contacto con el epitelio de la córnea. Esto puede ocurrir por el uso de lentes de contacto contaminadas, que actúan como vectores al transportar las amebas hasta el ojo, o bien por contacto directo de la lesión con agua, aire o elementos contaminados con trofozoítos y quistes (Niederkorn y col., 1999). Después de la unión del trofozoíto a células de la córnea, se inicia un proceso de descamación celular, producto de la citólisis, la fagocitosis y la apoptosis inducidas sobre las células epiteliales (Khan, 2006; Niederkorn y col., 1999). Si el proceso avanza, hay invasión del estroma, con inflamación intensa. Los trofozoítos secretan serina y cisteína proteasas, elastasa, metaloproteinasas, colagenasas y un activador del plasminógeno, compuestos encargados de destruir la matriz extracelular y permitir su acceso al estroma (Khan, 2006). Los trofozoítos afectan al nervio óptico y provocan una neuritis radial, responsable del dolor extremo que caracteriza a esta patología (Niederkorn y col., 1999). Los síntomas de QA incluyen fotofobia, visión borrosa, lagrimeo y dolor intenso. Los pacientes no responden a la terapia antimicrobiana y el cuadro clínico muchas veces se confunde con una queratitis de origen herpético, lo que retarda la instauración de un tratamiento adecuado. Cuando el cuadro está avanzado se presenta un característico anillo de infiltrado corneal rodeando la lesión. La córnea puede llegar a ulcerarse y requerir un trasplante o, en casos extremos, la enucleación del ojo (Khan, 2006; Marciano-Cabral y col., 2003; Niederkorn y col., 1999).

El tratamiento de la QA requiere la administración tópica de biguanidas (polihexametilen biguanida 0,02% o clorhexidina dicluconato 0,02%) combinadas con alguna diamidina, un antibiótico para las infecciones bacterianas asociadas, un analgésico y antiinflamatorios esteroideos. El tratamiento es muy prolongado, lo que provoca molestias y perjuicios económicos a los pacientes, pero es necesario para minimizar las posibilidades de recrudecimientos de la enfermedad (Khan, 2006).

Con el objetivo de identificar, diagnosticar etiológicamente e iniciar un registro de casos en nuestra región se analizaron en el periodo 2007-2012 cuatro casos de pacientes con signos y síntomas compatibles con procesos de QA. Se estudiaron biopsias de córnea, líquidos y lentes de contacto, los que fueron remitidos al laboratorio de la Cátedra de Parasitología Clínica del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, desde el Centro Óptico *Megavisión*, Bahía Blanca, Argentina, encargado del reconocimiento de los casos y del procedimiento quirúrgico de obtención de las biopsias.

Caso 1: Paciente de 11 años de edad, usuaria de lentes de contacto descartables. Presentó, a la consulta, infiltrado corneal en el ojo izquierdo. Se remitieron al laboratorio 4 lentes: 3 del ojo derecho y 1 del ojo izquierdo, y dos envases de líquidos comerciales para conservación de las mismas. La paciente no había recibido tratamiento antibiótico previo.

Caso 2: Paciente de 31 años de edad, usuaria de lentes de contacto blandas y con hábitos de higiene y conservación inadecuados de las mismas (lentes de 3 años de antigüedad, cambio de la solución conservadora cada 2 o 3 días y enjuague con agua corriente). Consultó por enrojecimiento y dolor severo en ojo derecho de dos meses de evolución. La paciente había concurrido un mes atrás a otro centro donde le habían realizado un raspado de la lesión corneal. Los análisis bacteriológicos de la muestra, de las lentes de contacto y del estuche de las mismas habían arrojado resultados negativos. Fue tratada con antibióticos, corticoides, antivirales y lágrimas artificiales.

Dieciséis días después del primer análisis, y sin respuesta al tratamiento instaurado, la paciente se presentó en nuestro grupo de trabajo. De acuerdo con estos antecedentes y luego de exámenes oftalmológicos donde se observó el tipo de lesión que presentaba (Fig. 2.19: a y b) se sospechó una etiología parasitaria. Se le realizó una biopsia incisional corneal con cuchillete, en el quirófano, y el material obtenido se dividió en dos partes: una se colocó en un tubo eppendorf con solución de Page (Page, 1976) estéril para el análisis

parasitológico y la otra en tubo seco estéril para análisis bacteriológico. Estos dos tubos, más el líquido de lavado y el estuche de las lentes, fueron remitidos a nuestro laboratorio para su procesamiento. Con la presunción clínica y los datos epidemiológicos se inició inmediatamente el tratamiento contra infección por *Acanthamoeba* sp., mientras se esperaba el resultado de los cultivos.

Caso 3: Paciente femenina de 25 años de edad, usuaria de lentes de contacto. Consulta por molestia bilateral de una semana de evolución, sin dolor, con fotofobia. Se remitieron al laboratorio las lentes de contacto y el líquido de conservación contenido en el estuche que estaba usando al momento de la consulta. Dada las características de las lesiones que presentaba en ambos ojos, inmediatamente se inició el tratamiento contra Queratitis de origen parasitario, por *Acanthamoeba* sp.

Caso 4: Paciente femenina de 23 años de edad, consulta por fotofobia y dolor intenso de menos de 24 horas de evolución. Usuaria de lentes de contacto descartables con malos hábitos de higiene y cuidado de las mismas (uso prolongado, cambio de la solución conservadora poco frecuentes, a veces los conservaba con solución fisiológica o con agua de la canilla). En el examen presentó ojos rojos y queratitis superficial. Se tomaron muestras corneales y conjuntivales con hisopos estériles y se remitieron al laboratorio junto con las lentes de contacto, sus estuches, y los líquidos comerciales que estaba utilizando en ese momento.

Materiales y métodos:

El oftalmólogo remitió la muestra (biopsia de córnea) conservada en tubos ependorf. En el laboratorio se tomó una parte para análisis parasitológico y otra para el bacteriológico, el cual fue remitido a la cátedra de Microbiología especial del Dto. BByF-UNS, para su procesamiento, en forma estéril.

Para el análisis parasitológico: a los tubos con la mitad de la biopsia se les adicionó 1,5 ml de solución de Page estéril y se centrifugaron un minuto en microcentrífuga a 2000 rpm,

se descartó parte del sobrenadante y se recogió, el sedimento con pipeta automática y la porción de tejido con ansa bacteriológica. Ambos se sembraron en Agar no nutritivo (ANN) cubierto con una suspensión de *Escherichia coli,* según Page (Page 1976).

Los líquidos, de lavado de las lentes y del estuche, se centrifugaron a 2000 rpm a volumen cero por 10 min en tubos plásticos con tapa, estériles y se sembraron siguiendo el mismo procedimiento.

Las lentes de contacto de ubicaron en el centro de una placa de Petri con ANN, y se cubrieron con una suspensión de *E. coli* en solución de Page.

Los hisopos se colocaron en el centro de una placa de ANN, y sobre estos se colocó una suspensión de *E. coli* en Page.

Para todas las muestras las placas se incubaron en estufa a 37º C. Se observó el material al microscopio óptico en fresco, entre porta y cubreobjetos, y se realizaron extendidos que se fijaron con metanol a 4°C para ser coloreados con May Grunwald-Giemsa y Giemsa.

Para los cultivos positivos se realizó el análisis morfológico y morfométrico de los quistes.

Para la identificación molecular a nivel de género se utilizó la técnica PCR siguiendo el protocolo publicado por Schroeder y col., 2001 (Ver Capítulo 6).

Los estudios ultraestructurales de las amebas aisladas se realizaron por Microscopía Electrónica Transmisión (TEM), siguiendo las técnicas clásicas adecuadas para el estudio de protozoos (Costamagna y col., 1996).

Las muestras remitidas para el análisis bacteriológico se sembraron en caldo Tioglicolato, agar sangre y agar chocolate. Los medios sólidos se incubaron en microaerofilia durante 48 h a 37 ºC y el caldo de enriquecimiento, durante 7 días, en las mismas condiciones. Los caldos se examinaron diariamente para investigar el crecimiento bacteriano, realizando repiques en agar sangre y agar chocolate.

Resultados:

Caso 1: Muestras negativas para *Acanthamoeba*. La paciente al momento de la consulta recibió tratamiento con Neoftalm colirio (Trimetoprima y polimixina b) cada 2 h. A las 24 h ya había mejorado la apariencia de la lesión sin evidencia de daño corneal.

Caso 2: Tanto la biopsia como el líquido de lavado analizado fueron positivos para *Acanthamoeba* spp. a las 48 h de incubación. Los análisis bacteriológicos resultaron negativos. Inicialmente el tratamiento con Polihexametil-biguanida al 0.02% y Neomicina al 0.5% fue con aplicaciones cada ½ hora durante el día y la noche, los periodos de aplicación se fueron espaciando y a los dos meses de iniciado el tratamiento las aplicaciones se realizaron cada 4 horas durante el día y cada 3 horas durante la noche. Seguidamente se redujo a 6 veces al día hasta completar el año. A los tres meses de iniciado el tratamiento ya se observaba mejoría en la zona lesionada, y el absceso se fue cerrando quedando solo una pequeña región ulcerada. A los 6 meses se observó buena respuesta al procedimiento terapéutico; la lesión vascularizó periféricamente y en forma lenta (Fig. 2.19 c y d). Al año se le concede el alta.

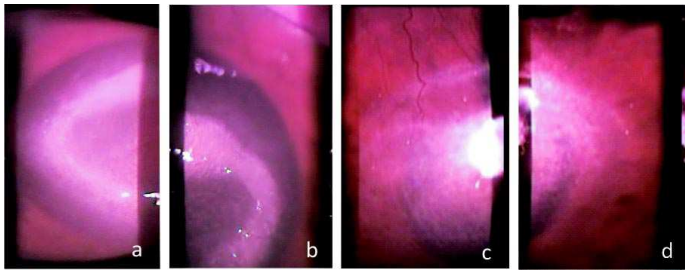


Figura 2.19. (a) y (b), anillo de infiltración corneal característico de la infección por *Acanthamoeba*; (c) y (d) leucoma corneal cicatrizal postratamiento.

Caso 3: El cultivo de las lentes y de los líquidos contenidos en los estuches resultó positivo para el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. Inicialmente la paciente recibió tratamiento con Polihexametilbiguanida al 0.02% y Neomicina al 0.5% cada 2 horas durante el día, y

cada 3 horas durante la noche por un período de 15 días. Posteriormente las aplicaciones se fueron espaciando; al mes de la primera consulta la aplicación de los agentes se realizó cada 4 horas durante el día y cada 6 horas durante la noche. A los 50 días ya presentó vascularización en la zona lesionada. Actualmente la paciente continúa en evaluación periódica.

Caso 4: Todas las muestras remitidas resultaron negativas para el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. Al momento de la consulta se inició tratamiento tópico con Gatifloxacina y Poenbioptal NF (que contiene Neomicina) en forma horaria e intercaladas. A las 24 h había disminuido la irritación conjuntival y la fotofobia. La paciente continuó con el tratamiento, con aplicaciones mas espaciadas. Actualmente sigue en observación y sin el uso de lentes de contacto.

Los aislamientos correspondientes al caso 2 y 3 fueron clasificados morfológicamente como pertenecientes al género *Acanthamoeba* (Page 1976).

Por microscopía óptica se observaron trofozoítos de 19,0 a 25,3 µm de diámetro, con acantópodos, núcleo único refringente, vacuolas de exclusión de agua contrayéndose y dilatándose constantemente y movimiento tipo babosa por la emisión de seudópodos hialinos (Fig. 2.20: a-c). Los quistes presentaron un tamaño de 11,3 µm a 13,0 µm de diámetro y una pared doble, compuesta por un exoquiste ondulado y un endoquiste estrellado (Fig. 2.20: d y e)**.** Según la clasificación de Pussard y Pons (1977), basada en la morfología y el tamaño de los quistes, ambos aislamientos pertenecieron al Grupo II.

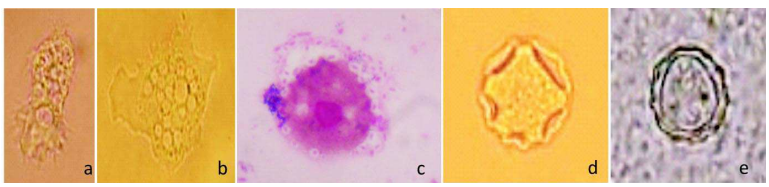


Figura 2.20. Trofozoítos de *Acanthamoeba* en fresco, aislados de la biopsia (a) y del líquido de lavado (b). Trofozoítos aislados de la biopsia, teñidos con Giemsa (c). Quistes de *Acanthamoeba* en fresco (d y e), con las características correspondientes al Grupo II de Pussard y Pons (13)

Los productos obtenidos de la **PCR** (Fig. 2.21) correspondieron al segmento ASA.S1 (del inglés *Acanthamoeba*-specific amplimer S1), específico del género *Acanthamoeba*, con lo cual se confirmó la clasificación genérica que habíamos realizado, basada en sus caracteres morfológicos.

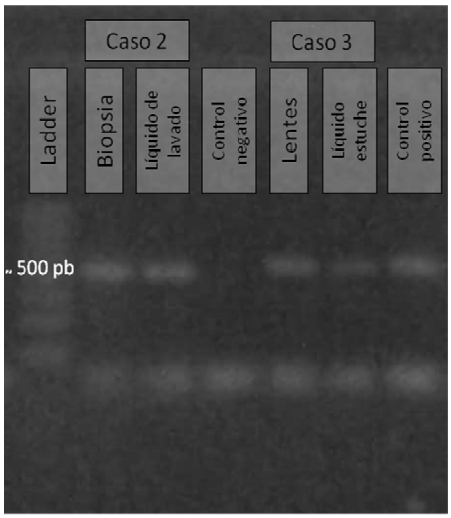


Figura 2.21: Gel de agarosa con los productos de la PCR, donde se observan los segmentos de 423 a 551 pares de bases (pb) específicos del género *Acanthamoeba* para las distintas muestras analizadas. (Ladder: marcador de peso molecular).

Por **TEM**, es posible observar en el citoplasma de quistes y trofozoítos, numerosas mitocondrias, vacuolas de exclusión de agua, vacuolas digestivas de contenido amorfo, gotas de lípidos y un núcleo único con nucléolo central esférico; complejo de Golgi y retículo endoplásmico bien visible (Bowers y col., 1968; 1969). En los trofozoítos se visualizó el contorno celular irregular resultado de la formación de numerosos acantópodos y seudópodos; por debajo de la membrana plasmática se observó una zona de citoplasma hialino: el ectoplasma. Pequeñas vacuolas de exclusión de agua se encontraban distribuidas por todo el citoplasma, circundadas en la mayoría de los casos, por mitocondrias alargadas o esféricas (Fig. 2.22 a). Los quistes maduros se visualizaron rodeados por un exoquiste, separado del endoquiste por un espacio, excepto en los

ostiolos, donde las membranas se fusionaban. El citoplasma se observó denso, deshidratado (Fig. 2,22 b). En el capítulo 4 se amplía descripción por TEM.

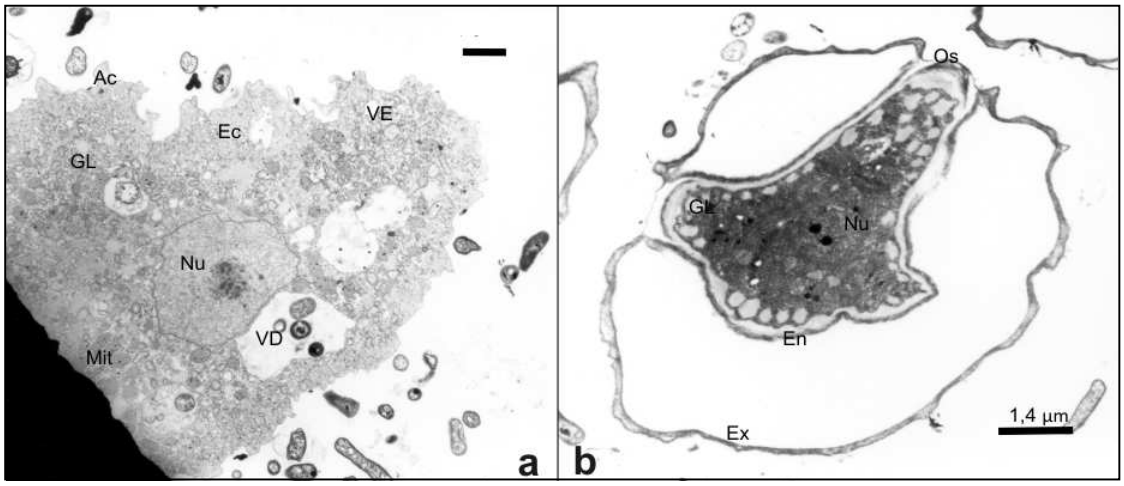


Figura 2.22. Fotomicrografías de *Acanthamoeba* obtenidas por TEM. (a) trofozoíto aislado de la biopsia; (b) quiste. Ac: acantópodos, Ec: ectoplasma, VE: vacuolas de exclusión de agua, GL: gotas de lípidos, Mit.: mitocondrias, Vd: vacuolas digestivas, Nu: núcleo, Ex: exoquiste, En: endoquiste, Os: ostiolo.

El agente etiológico de queratitis aislado de de la biopsia y el líquido del caso 2, así como las amebas aisladas de los lentes de contacto y los líquidos del caso 3, fueron identificados, morfológica y molecularmente, como perteneciente al género *Acanthamoeba*. Según la clasificación de Pussard & Pons (Pussard 1977) la cepas aisladas pertenecerían al Grupo II, donde se encuentran especies de demostrada patogenicidad.

Conclusiones:

Si bien la QA presenta baja prevalencia, es importante tener presente este tipo de etiología al momento del diagnóstico oftalmológico. El aislamiento de *Acanthamoeba* es de baja complejidad y de escaso costo; su implementación en los laboratorios bioquímicos aumentaría la posibilidad de confirmar nuevos casos. No obstante, la tipificación molecular requiere de aparatología más compleja y profesionales entrenados en el uso de las mismas.

Un diagnóstico rápido y certero permite un tratamiento efectivo y previene acciones drásticas como la enucleación o el trasplante de córnea. El comienzo oportuno del tratamiento, además de preservar la integridad del ojo parasitado, evita la formación de quistes, lo que minimiza las posibilidades de recidivas.

Es muy importante, como medida preventiva, alertar a los usuarios de lentes de contacto sobre el uso y cuidados adecuados de las mismas, con el objeto de que disminuyan las posibilidades de contraer queratitis por *Acanthamoeba.*

2.3 Otras muestras

2.3.1. Búsqueda de AVL en soluciones conservadoras de los estuches para lentes de contacto en la ciudad de Sarmiento, Chubut, Argentina.

Introducción:

Como comentamos oportunamente, los usuarios de lentes de contactos representan la población en mayor riesgo de contraer QA. Las lentes pueden actuar como vehículos transportando las amebas desde el ambiente hasta los ojos. Una forma eficaz de evitar esta infección es el manejo adecuado de las lentes, que consiste, básicamente, en una buena limpieza y en la "utilización responsable" de las mismas.

Actualmente, existen en el mercado soluciones multipropósito para la limpieza, conservación y mantenimiento de las lentes en sus estuches. La mayoría de las marcas incluyen algún derivado de las biguanidas como agente desinfectante para estos protozoos. Es por ello que una vez que el usuario deja de utilizar sus lentes es imprescindible que las conserve en este tipo de soluciones para evitar contaminaciones con estas amebas y otros microorganismos.

La presencia de *Acanthamoeba,* u otras AVL, en las soluciones que se encuentran en los estuches de los lentes de contacto nos estaría indicando la potencialidad de nuevos casos de QA y la ineficiencia de la solución conservante en la eliminación de las mismas.

Con el antecedente de la presencia de AVL en el ambiente de la ciudad de Sarmiento (Chubut, Argentina) y dada la importancia epidemiológica que los vientos, característicos de la región, tienen en la diseminación de microorganismos, fue que se planteó el siguiente **objetivo**: realizar la búsqueda de AVL en estuches de lentes de contacto e investigar la ocurrencia de casos clínicos de QA en los habitantes de la ciudad de Sarmiento.

Materiales y métodos:

Para la selección de la población a estudiar se tuvo en cuenta la comunicación personal del dueño de la única óptica de la ciudad de Sarmiento, quien nos informó que alrededor de 20 a 30 personas compraban habitualmente productos para higiene y mantenimiento de las lentes. Al tratarse de una localidad pequeña, se pudo identificar a los usuarios, y se les propuso la realización de una encuesta sobre el uso, cuidado e higiene de las lentes por parte de los mismos (Anexo 2.1). Se realizaron un total de 20 encuestas.

Además se concretó una entrevista con el médico Oftalmólogo que visita periódicamente la localidad investigando, retrospectivamente, la presencia de algún caso de QA en la población (Anexo 2.2).

A cada una de las personas encuestada se le solicitó la entrega de los estuches de sus lentes, en las condiciones en que estuvieran y con el líquido conservante en su interior, reemplazándoselos por un estuche nuevo, adquiridos para esta investigación.

Los estuches se enviaron a la Cátedra de Parasitología Clínica de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Argentina). El líquido que contenían se trasvasó, en condiciones de esterilidad, a tubos eppendorf estériles, y este material se procesó y utilizó en el cultivo para la búsqueda de AVL.

Resultados:

La totalidad de los encuestados eran usuarios de lentes de contacto (LC); el 85% las utilizaba por recomendación de un médico oftalmólogo y eran lentes recetadas y con aumento. El 15% restante lo hacía solo por cuestiones cosméticas, como cambio de color del iris.

La distribución de los encuestados según las horas de uso de las lentes de contacto se muestra en la Fig. 2.23. Solo el 10% de los encuestados manifestó dormir con las LC puestas.

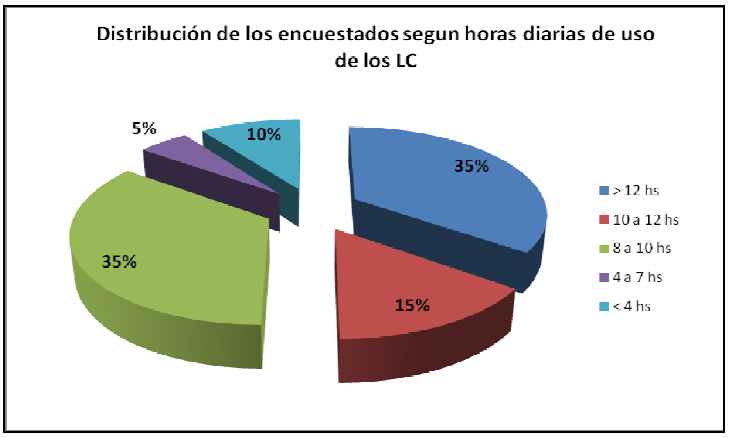


Figura 2.23: Gráfico de distribución de la población según horas diarias de uso de los LC

Todos los encuestados refirieron el uso de productos comerciales para la limpieza y conservación de las LC. El 75% de la población estudiada utilizaba la misma marca comercial de líquido.

En cuanto a la limpieza de los LC, el 69% realizaba una limpieza diaria, que es lo recomendado por los contactólogos, mientras que solo el 36% cambiaba diariamente el líquido de los estuches.

El 55% utilizaba lentes blandas desechables de una duración de un mes y solo la mitad de ellos renovaba sus lentes según lo recomendado por especialistas; y el resto, 45% utilizaba lentes blandas con una vida útil de alrededor de un año.

De los encuestados el 45% practicaba deportes acuáticos con las lentes puestas, y de estos solo el 12% higienizaba sus LC después de ello.

De la población estudiada el 25% manifestó haber padecido algún tipo de lesión ocular desde que usaba las LC. Entre ellas se mencionaron: úlceras y derrames. También se informaron daños de las LC. Ningún caso estuvo relacionado con etiología parasitaria.

A diferencia de otros trabajos (Martín y col., 2008) el 100% de los estuches analizados resultaron negativos para el aislamiento de AVL.

Conclusiones:

El uso inadecuado de lentes de contacto representa riesgo elevado para cualquier tipo de infección ocular, no solo para las de origen parasitario. En la población estudiada presentaba conductas que aumentaban todavía más el riesgo de contraer QA.

El 45% de los encuestados practicaba deportes acuáticos con las LC puestas. Sabemos que el agua es una de los vehículos más importantes de *Acanthamoeba* y que este género está ampliamente distribuido en las aguas de Sarmiento; esto, sumado a que la mayoría de la población no higienizaba las lentes inmediatamente después de estas prácticas, aumenta el riesgo de contraer QA.

En cuanto al uso diario de las LC, el 45% de los encuestados las utiliza por un tiempo mayor al recomendado. Para usuarios con una buena producción de lágrimas y sin otra condición comprometedora, el tiempo de uso recomendado por los especialistas es de 8 a 10 h diarias. El uso prolongado aumenta las probabilidades de daño corneal, y de infecciones.

El 10% de los encuestados manifestó dormir con las lentes puestas. Para preservar el tejido corneal es necesario que el oxígeno del ambiente atraviese todo el espesor de la lente hasta llegar a la córnea lo que es favorecido por el reflejo del parpadeo. El hecho de dormir con las LC puestas, priva a la córnea de este intercambio trayendo como consecuencia la edematización de la misma, y otras complicaciones como infección, neovascularizacion, etc. Por ello es que no se recomienda dormir con las lentes puestas, ni aún por espacios cortos de tiempo.

En cuanto a las condiciones de limpieza, todos manifestaron utilizar productos comerciales, lo cual fue positivo. Un poco más de la mitad de los participantes limpiaba sus LC a diario, como se recomienda, y pocos eran los que cambiaban la solución de los estuches diariamente como está indicado. La limpieza diaria, según los instructivos de los productos comerciales, consiste en colocar unas gotas de la solución en la palma de la mano y sobre ésta colocar la lente y frotarla suavemente con la yema del dedo. Esto es principalmente para eliminar cualquier partícula adherida durante el uso. La renovación

diaria del líquido de los estuches asegura que éste se encuentre en buenas condiciones, sin contaminantes y con su capacidad desinfectante plena.

Aproximadamente la mitad de la población utilizaba lentes descartables, y de ellos solo la mitad los renovaba en tiempo y forma. La utilización de estas lentes por un tiempo mayor al recomendado por los fabricantes hace que el material del que están construidas se deteriore, aumente su grosor, con lo cual se dificulta aún más el pasaje de oxígeno a través de la lente, y se depositen sustancias en su superficie, facilitando así la infección del ojo.

Los resultados obtenidos en este punto sorprenden y difieren de los esperados. No se observó crecimiento de AVL en ninguna de las muestras analizadas a pesar de que la gran mayoría de los usuarios encuestados no respetaba en forma correcta las nomas de cuidado y limpieza para el uso de LC. Consideramos que este resultado podría atribuirse al uso de soluciones comerciales efectivas para la conservación y limpieza de las lentes.

Agradecemos la colaboración de la Dra. Erna Giagante y Dr. E. Sgattoni del centro Óptico *Megavisión*, de la ciudad de Bahía Blanca, por los aportes de casos oftalmológicos para realizar este apartado, y a los alumnos de la Escuela Agropecuaria N° 725 de Sarmiento, en la Feria Provincial de Ciencias y Tecnología de la Provincia del Chubut, por la colaboración en la obtención de datos para el apartado 2.3.1 del presente capítulo.

Anexo 2.1: Encuesta realizada a los usuarios de lentes de contacto de sarmiento Chubut.

LENTES DE CONTACTO Y AMEBAS DE VIDA LIBRE.

OBJETIVOS: Búsqueda de Amebas de Vida Libre en los estuches porta lentes de contacto y/o en los lentes de contacto desechables.

Método: Se realizara una encuesta a personas que usan lentes de contacto en la localidad de Sarmiento –Provincia del Chubut.

NOMBRE DEL ENCUESTADOR: Luciana Rodríguez.

ENCUESTA:

A.- DATOS PERSONALES:

Nombre y apellido:			
SEXO	(F) M	EDAD AÑOS: 33	TIEMPO DE RECIDENCIA EN SARMIENTO AÑOS: 3 Años

B.- USO DE LENTES:

- ¿Cuánto hace que los usa? 20 Años.
- ¿Cuántas horas al día? 15 hs.
- ¿Duerme con los lentes puestos ¿
  SI ~~NO~~

C.- ¿Qué tipo de lentes utiliza?

☒ TERAPEUTICOS ☐ COSMETICOS (cambio de color) ☐ CONVENCIONALES

D.-Textura de las lentes.

☒ BLANDAS ☐ RIGIDAS (duras) ☐ SEMIRIGIDAS (porosas)

☒ DESECHABLES DURACION UN MES ☐ DESECHABLES DURACION DE UN AÑO

E.-CUIDADO DE LOS LENTES DE CONTACTO.

- ¿Con que frecuencia los limpia?
  5 DIAS.
- ¿cada cuanto renueva el líquido del estuche?
  CADA 4 DIAS.

- Nombre de la solución:

NATURA

- ¿Cada cuanto renueva el estuche guarda lentes?

2 MESES.

- ¿Cada cuanto cambia los lentes de contacto?

un mes y medio.

E.- DE LAS PRACTICAS DE RECREACION

Se baña en:

☒ LAGOS ☐ CANALES ☐ RIO ☐ PILETA CUBIERTA

F.- ¿Con que frecuencia?	EPOCA DE VERANO.

G.- ¿Se baña con los lentes puestos?

SI ☒ NO ☐

H.- ¿Posterior al baño los lava?

SI ☐ NO ☒

I.- ¿Con que?

AGUA DEL LUGAR ☐ AGUA DE LA CANILLA ☐ SOLUCION DE LAVADO ☐

J.- ¿Tuvo alguna lesión en la vista?

SI ☐ NO ☐

K.- ¿Cuál?

L.- ¿Fue tratada la lesión?

SI ☐ NO ☐

M.- ¿Conoce otra persona de Sarmiento que utilice lentes de contacto?

SI ☐ NO ☒

N.- ¿Conoce a personas que tuvieron lesiones en la vista?

SI ☒ NO ☐

ANEXO 2.2: Encuesta realizada al Medico Oftalmólogo del Hospital Rural Sarmiento.

Encuesta realizada al oftalmólogo de nuestra localidad:

Nombre: XXXXXXXXX.

-¿Conoce las AVL?

Si, conozco estos Protozoos.

-¿Tiene información sobre QA?

Sí, he leído algunos trabajos publicados sobre el tema. He visto esta patología en el transcurso de mi carrera en otra ciudad.

-¿Recomienda el uso de lentes de contacto?

Sí, aunque recomiendo que se debe tener precaución respecto del uso en días ventosos, y remarco los cuidados que necesitan las lentes.

-¿Tuvo algún caso de QA en nuestra localidad, Sarmiento?

No, no tuve ningún caso. Pero como dije, le he visto en otras ciudades.

-¿Cuál fue el tratamiento indicado para dicha enfermedad?

Esos casos se trataron con gotas con Neomicina, previo diagnóstico .Algunos derivados de Biguanidas, Brolene, Clorehexilina (preparado hecho en farmacias).

El tratamiento es prolongado entre 6 y 7 meses. En casos muy avanzados de QA hay que realizar un trasplante de córnea.

-¿Registró alguna enfermedad con el uso de lentes de contacto en nuestra localidad?

Sí, tuve casos de queratitis infecciosa, no parasitaria, y también daños en los ojos por erosión mecánica producto del uso de las lentes.

-¿Hace cuanto reside en Sarmiento?

Hace 2 años aproximadamente.

-¿Qué líquido recomienda para el cuidado, limpieza de lentes de contacto?

No recomiendo ninguno en especial, siguiendo las normas de higiene y cuidado de las lentes no debería haber ningún problema.

-Aproximadamente, ¿a cuántas personas de Sarmiento le ha recomendó lentes de contacto? A 4 personas aproximadamente.

2.3.2 Búsqueda de AVL en muestras biológicas destinadas a análisis bacteriológicos.

Introducción:

Acanthamoeba puede aislarse de muestras clínicas de LCR y biopsias de tejido cerebral en casos de EAP, de biopsias o raspados corneales en casos de QA y de biopsias de piel en los casos de AC. En infecciones diseminadas se aisló de muestras de tejido pulmonar, hepático y esplénico. También se halló en hisopados nasales y faríngeos, lavados pulmonares, muestras de materia fecal, muestras óseas y líquido sinovial (Khan, 2009).

Vimos que, además de su patogenicidad propia, *Acanthamoeba* puede actuar como vehículo y/o reservorio ambiental de distintos microorganismos que han desarrollado la capacidad de sobrevivir en su interior. Entre éstos se destacan bacterias (*Legionellaceae, Pseudomoneaceae, Mycobacteriaceae, Parachlamydiaceae,* etc.), virus (Mimivirus, Enterovirus), hongos (*Cryptococcus neoformans)* y protozoos *(Crytosporidium)* (Greub y col., 2004; Gomes-Couso y col., 2007).

El **objetivo** de esta sección fue realizar la búsqueda de AVL en muestras biológicas procedentes de procesos patológicos, destinadas a análisis bacteriológicos, y estimar su posible participación en producción de enfermedad.

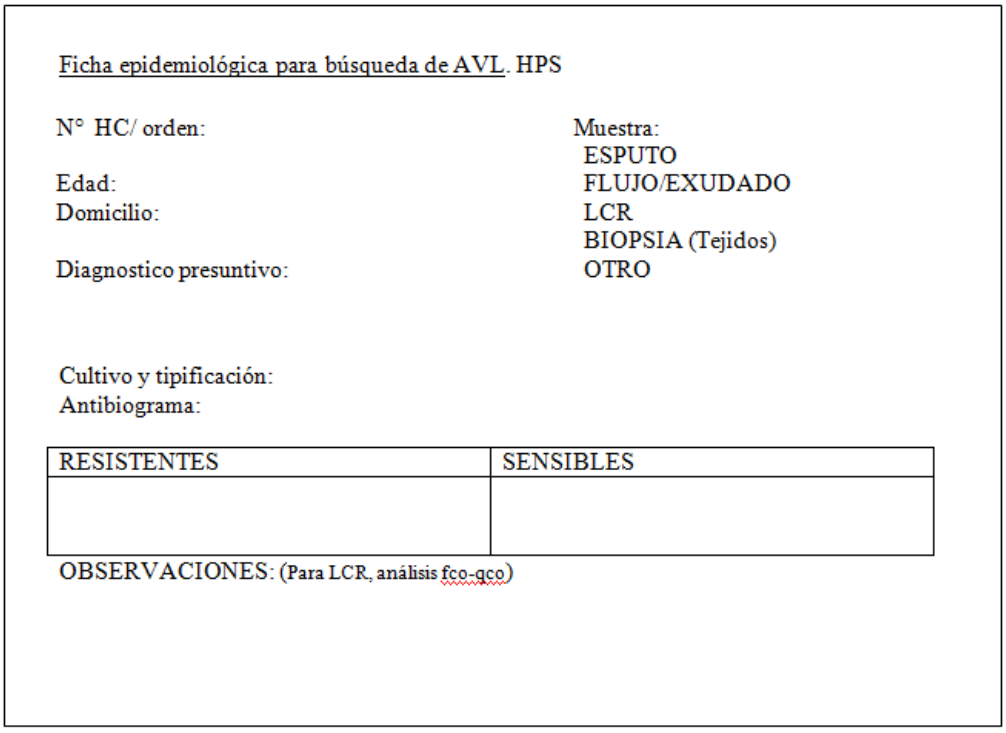
Esta investigación se realizó en el marco del proyecto: “Investigación de endosimbiontes en *Acanthamoeba* spp. y otras Amebas de Vida Libre: Importancia como vectores de patógenos para el hombre. Estudio prospectivo en Bahía Blanca, Argentina”. Desarrollado en la Cátedra de Parasitología Clínica en conjunto con LABSUR-Microbiología, Hospital Privado del Sur. Aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Privado del Sur. Período 2009-2011.

Materiales y métodos:

Se investigó la presencia de AVL en muestras de flujo vaginal, exudados uretrales, Líquido Cefalorraquídeo (LCR), esputo, aspirados traqueales, secreciones oculares, líquidos de punción (articular, abdominal, pleural, intra vesicular, etc.) y otras muestras (biopsias, tejidos blandos, material de abscesos, derrames, etc.), recolectadas y mantenidas en forma estéril. Durante el período 2009-2011 se analizaron un total de 166 muestras.

Las muestras fueron remitidas desde el Laboratorio de Microbiología del Hospital Privado del Sur (HPS) a la Cátedra de Parasitología Clínica junto con una ficha epidemiológica que registraba los datos de la muestra (Fig. 2.24).

Una vez en el laboratorio se realizaron cuatro extendidos de cada muestra, uno para observación directa y los otros para tinciones: May-Grunwald Giensa, Giemsa prolongado y Gram. El cultivo de las mismas se efectuó como ya fuera indicado precedentemente, en ANN.



Ficha epidemiológica para búsqueda de AVL. HPS

N° HC/ orden:

Edad:
Domicilio:

Diagnostico presuntivo:

Muestra:
ESPUTO
FLUJO/EXUDADO
LCR
BIOPSIA (Tejidos)
OTRO

Cultivo y tipificación:
Antibiograma:

RESISTENTES	SENSIBLES

OBSERVACIONES: (Para LCR, análisis fco-qco)

Figura 2.24: Ficha Epidemiológica utilizada para registrar los datos de cada una de las muestras analizadas

Los datos de la ficha se transcribieron a una base de datos creada en el programa Epi Info 3.5.3, la cual permite la realización de análisis estadísticos posteriores (Fig. 2.25).

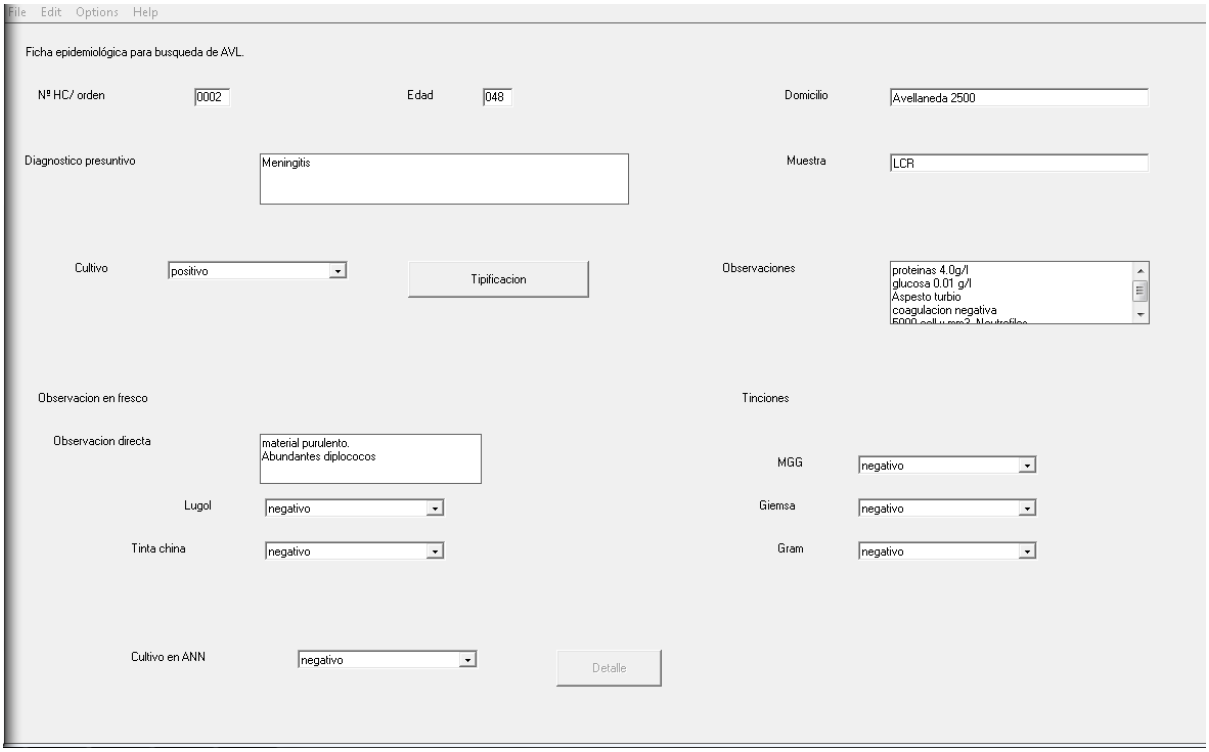


Figura 2.25: base de datos del programa Epi Info 3.5.3

Resultados:

Los tipos de muestras analizadas y su distribución se muestran en la Fig. 2.26. No se hallaron muestras positivas para AVL, ni bacterias endosimbiontes en las mismas. Solo el 39% de las muestras fueron positivas para el aislamiento de bacterias por los métodos de cultivos convencionales.

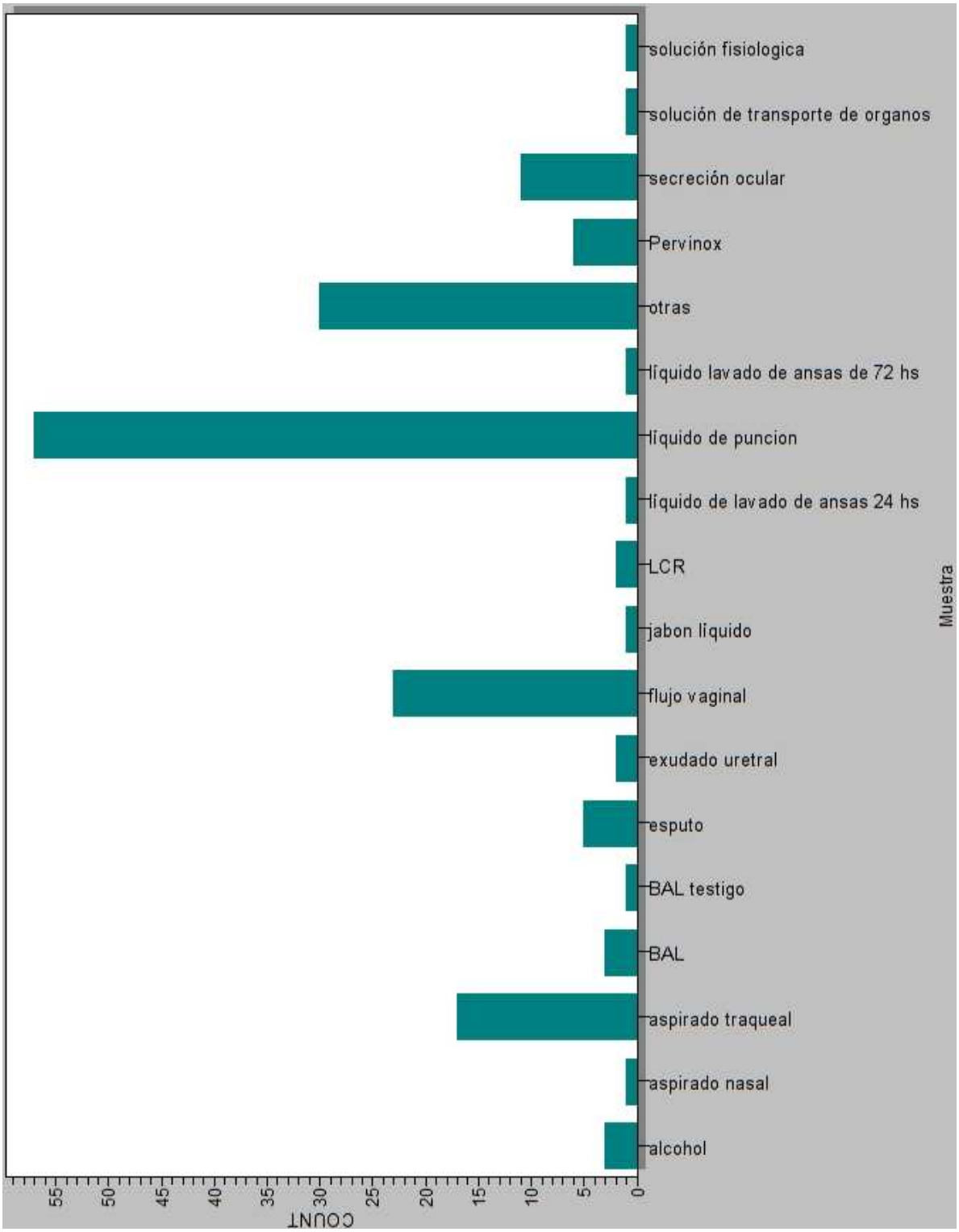


Figura 2.26: Distribución y tipos de muestras (BAL: Lavado bronquealveolar).

Capitulo 3

Resistencia de *Acanthamoeba*

Desde el descubrimiento de las AVL como agentes causales de enfermedad se ha testeado la actividad amebicida de varios compuestos, con el fin de aplicarlos al tratamiento de las infecciones causadas por amebas o bien para utilizarlos como desinfectantes ambientales, tanto sobre trofozoítos como sobre quistes.

Acanthamoeba es el género aislado con mayor frecuencia, y el que produce la mayoría de los casos de infección en humanos, o al menos los que se diagnostican con mayor frecuencia. Nuestros hallazgos en el ambiente respaldan la designación de ubicuista para el género, y demuestran su presencia y amplia distribución en nuestra región y en otras provincias de la República Argentina.

Varios agentes quimioterapéuticos, extractos naturales y compuestos químicos se han testeado *in vitro* para determinar su efecto sobre especies de *Acanthamoeba*. Los resultados han sido variables, y algunos cuestionables, ya que las diferentes cepas presentan comportamientos versátiles dependiendo de las condiciones de cultivo, de su virulencia o de su capacidad de crecimiento.

En muchos casos el inconveniente de estas experiencias es la falta de correlación entre los resultados que se obtienen *in vitro* y los esperados *in vivo*. Hay que tener en cuenta que los protozoos son células eucariotas, por lo que muchos de los agentes tóxicos para ellos también lo serán para células humanas, lo que limita aún más su utilidad en el tratamiento de las infecciones.

Se testearon agentes como las biguanidas, detergentes catiónicos y antifúngicos, que actúan a nivel de la membrana plasmática. De ellos la biguanida es clave en el tratamiento de los casos de QA. Si bien es un desinfectante que se utiliza en piletas de natación, posee actividad trofocida y quisticida sobre *Acanthamoeba*, con efectos tóxicos mínimos sobre la superficie de la córnea, y es uno de los componentes principales de las soluciones

comerciales de limpieza de las lentes de contacto (Larkin y col., 1992; Burger y col., 1994; Khan, 2009).

Antifúngicos como la Rifampicina y la 5-fluorocitosina, que actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, resultaron efectivos in vitro y en animales de experimentación para la eliminación y control de las infecciones por *Acanthamoeba* (Khan, 2009).

Inhibidores del metabolismo como Ketoconasol, Sulfadiazinas y Neomicinas, entre otros, también fueron testeados con resultados prometedores, y de hecho son las que se utilizan, combinadas con otros agentes, en el tratamiento de las infecciones del SNC por *Acanthamoeba* y otras AVL (Khan, 2009).

Entre los agentes físicos, el calentamiento de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* resultó ser una buena herramienta para su eliminación, ya que éstos no resisten el calentamiento por encima de los 60°C por más de 10 min. Este género resiste mejor las bajas temperaturas (Aksozek y col., 2002).

En los últimos años se produjo un gran avance en la utilización de productos naturales y aceites esenciales en el tratamiento de numerosas enfermedades. Es así que se realizaron varios ensayos para conocer el efecto de estos productos sobre las amebas. Extractos de *Buddelia cordata, Allium satinvun* (ajo), Propolis, *Agelos* sp (esponjas marinas), *Thymus sipyleus* y *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae), entre otras, mostraron actividad amebostática, trofocida y quisticida sobre *Acanthamoeba* (Rodriguez-Zaragosa y col., 1999; Pina-Vaz y col., 2004; Polat y col., 2007a; Topalkara y col., 2007; Proszenyak y col., 2007; Polat y col., 2007b; Rodió y col., 2008). Este tipo de compuestos representan una rama importante en la investigación de agentes para control de estos protozoos, principalmente por carecer de efectos tóxicos para el humano.

Entre los desinfectantes ambientales, el comportamiento del Cloro frente a cepas de *Acanthamoeba* fue ampliamente estudiado. Documentándose resultados variables, aunque todos coincidentes en que este género es altamente resistente al cloro (De Jonckheere y col., 1976; Mogoa y col. 2010).

Otros agentes químicos testeados que podrían emplearse para la eliminación de *Acanthamoeba* y otras AVL son sustancias halógenas, como bromuros, ioduros, aunque

ninguno de estos últimos fue efectivo en la destrucción de quistes de *Acanthamoeba* luego de 24 h de exposición. Desinfectantes como dióxido de cloro, Deciquan 222 (compuesto de amonio cuaternario) y ozono si fueron efectivos en la eliminación de trofozoítos de *Acanthamoeba*. El Deciquan 222 resultó el más seguro, siendo 20 veces más efectivo que el cloro en la eliminación de *Acanthamoeba* de aguas contaminadas (Cursons y col., 1980).

La eliminación de estos protozoos del ambiente o del hospedador, en caso de infecciones, es bastante compleja, y si bien varias sustancias in vitro resultaron efectivas, es difícil extrapolar los resultados para aplicarlos al tratamiento de las infecciones en humanos y animales.

El **objetivo** de este capítulo fue valorar la resitencia de cepas de *Acanthamoeba* spp., aisladas en la región, frente a diferentes compuestos químicos.

3.1. Resistencia de *Acanthamoeba* spp., frente a **soluciones cloradas**.

Introducción:

El cloro es el desinfectante más ampliamente usado en todo el mundo. Desde el 1900 se usa principalmente para la desinfección del agua por su fácil aplicación, control y su relativo bajo costo.

Se han realizado varios estudios para determinar las concentraciones de cloro necesarias para eliminar a especies de *Acanthamoeba* y otras AVL: En la década del 70´ se realizaron los primeros ensayos en los que se logró frenar el crecimiento de cepas de *Acanthamoeba* y *Naegleria* en aguas de piscinas con una concentración de cloro de 0,5 a 1,0 ppm (Derreumaux y col., 1974).

Estudios posteriores demostraron que el género *Acanthamoeba* es mucho más resistente a la cloración que *Naegleria*; y que dentro de éste, las cepas patógenas son más resistentes que las no patógenas (De Jonckheere y col., 1976).

El **objetivo** de esta sección fue evaluar la resistencia de quistes de *Acanthamoeba,* en una cepa ambiental y una patógena, pertenecientes cepas aisladas de diferentes sitos en nuestra ciudad, a diferentes concentraciones de cloro comercial, el agente más comunmente utilizado para la desinfección de aguas de consumo y recreación

Materiales y métodos:

Quistes: Se trabajó con dos aislamientos, clasificados morfológicamente como pertenecientes al género *Acanthamoeba.* Una cepa ambiental (CA), aislada del agua de una piscina cubierta, y una cepa patógena (CP) aislada de un caso de QA diagnosticado en nuestro laboratorio. Dichos aislamientos habían sido confirmados previamente por PCR,

como pertenecientes al género *Acanthamoeba* (Ver Capitulo 6: Tipificación molecular de los aislamientos de AVL).

Ambos se sembraron en medio MYAS (Malt extract-Yeast extract-Amoebae Saline: extracto de maltosa 0,01%, extracto de levadura 0,01% en solución de Page) con un inóculo de *Escherichia coli*, y se mantuvieron al menos por un período de dos meses para garantizar la obtención de quistes maduros.

Cloro: Se prepararon soluciones de cloro comercial, agua-lavandina (55g/l), en concentraciones crecientes, 24; 36; 48 y 60 partes por millón (ppm), en agua desionizada estéril.

Se usaron botellas de vidrio estériles con las distintas soluciones de cloro, a las que se les inocularon 1 ml de una suspensión de 1,3 x 10^5 quistes / ml en un volumen final de 125 ml. Los quistes fueron contados en cámara de Neubauer.

Para cada concentración, y a distintos intervalos de tiempo, 30 y 90 min; 3; 6 y 24 h, se tomaron alícuotas de aproximadamente 11 ml en un tubo estéril con un cristal de tiosulfato para detener la acción del cloro, previa homogeinización. Se contrastó con control sin cloro.

Estos tubos se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante reteniendo 1 ml aproximadamente, en el que se resuspendió el pellet que se utilizó para la siembra.

Siembra: Se realizó en ANN.

Las concentraciones de cloro que inhibieron el desarrollo de las cepas en ANN se consideraron con actividad quisticida positiva.

Se observaron al microscopio óptico los quistes expuestos a las distintas concentraciones de cloro para evidenciar posibles alteraciones morfológicas. Se documentó con microfotografías en microscopio óptico.

Resultados:

En la cepa ambiental (CA), aislada de piscina, las concentraciones de 24, 36 y 48 ppm no lograron inhibir el crecimiento dentro de las 24 horas de observación, mientras que con 60 ppm la actividad quisticida se evidenció a partir de las 3 horas de exposición.

Para la cepa aislada de la biopsia de córnea (CP), con 24 y 36 ppm se observó desarrollo hasta las 6 horas de exposición, mientras que con 48 y 60 ppm hasta las 3 horas (Fig. 3.1).

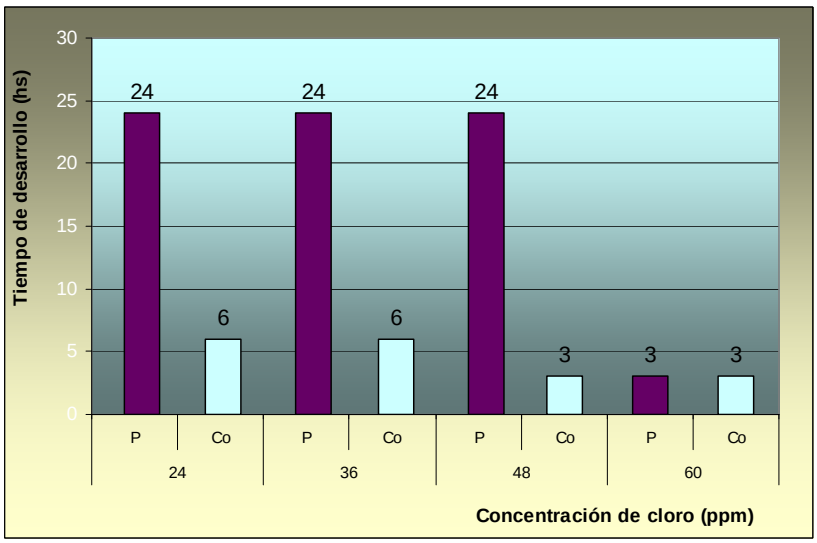


Gráfico 3.1: Desarrollo de los cultivos en relación con las concentraciones de cloro y el tiempo de exposición (**P**: Piscina; **Co**:

Los quistes expuestos al cloro, no mostraron alteraciones morfológicas detectables al microscopio óptico (Fig. 3.2).

Figura 3.2: Imágenes de quistes expuestos a las diferentes concentraciones de cloro. En la parte inferior se indican las ppm a las que fueron expuestas.

Conclusiones:

Con referencia a la acción quisticida del cloro, la especie de *Acanthamoeba* patógena (aislada del paciente con queratitis) mostró mayor sensibilidad a la acción del cloro, que la especie aislada de piscina. En ambos casos, para obtener efecto quisticida, fueron necesarias concentraciones de cloro muy superiores a las permitidas en el tratamiento del agua de red (≤ 0,2 ppm) y de recreación (≤ 2 ppm) por lo cual, el tratamiento con cloro no resulta útil, en forma directa, para su prevención y control, lo cual ratifica los hallazgos de De Jonckheere y col, (1976); pese a que en nuestro caso, la cepa ambiental resultó ser más resistente frente al cloro que la patógena.

Al ser el agua una de las principales fuentes de diseminación de *Acanthamoeba* y dada su extrema resistencia a la cloración, se recomienda una limpieza periódica de los reservorios de aguas (tanques, piscinas, etc.), así como una buena calidad microbiológica de la misma, ya que la presencia de bacterias favorece el desenquistamiento y crecimiento de *Acanthamoeba***.**

3.2. Eficacia de **soluciones comerciales multiuso** para lentes de contacto frente a quistes de *Acanthamoeba.*

Introducción:

Considerando que los usuarios de lentes de contacto son la población de mayor riesgo para las infecciones oculares por *Acanthamoeba*, y que los quistes de estos protozoos están ampliamente distribuidos en nuestro ambiente, el **objetivo** de esta sección fue estudiar la eficacia de soluciones comerciales multiuso para lentes de contacto frente a quistes de cepas de *Acanthamoeba* aisladas de la ciudad de Bahía Blanca, comparándolas con una cepa ATCC.

Materiales y métodos:

Cepas: Se analizó el comportamiento de tres cepas de *Acanthamoeba*:

-*Acanthamoeba polyphaga* (**AP**), ATCC 30461

-cepa de *Acanthamoeba* spp., aislada de una piscina cubierta de Bahía Blanca (**CA**)

-cepa de *Acanthamoeba* spp., aislada de un caso de Queratitis Amebiana diagnosticado por nuestro grupo (**QA**).

Se trabajó con cultivos en medio MYAS, los que se concentraron por centrifugación y se llevaron a una concentración de 1,2 x 10^5 quistes/ml.

Como control negativo se utilizó Solución Fisiológica (**SF**) estéril. Como Soluciones Multiuso (**SM**) de prueba se utilizaron las tres marcas comerciales disponibles en ópticas de la ciudad de Bahía Blanca (**SM1**, **SM2** y **SM3**) cuya composición se detalla a continuación:

- **SM1**: Composición: cada 100 ml contiene: PHMB 0,00025 g; EDTA disódico, tensioactivo no iónico, HPMC, ácido bórico, borato de sodio, cloruro de sodio, agua purificada c.s.p. 100 ml.

- **SM2**: Fórmula: cada 100 ml contiene: Poliaminopropilbiguanida 0,1 mg; Poloxamer 407 0,01 g; Edeato Disódico $2H_2O$ 25 mg; Cloruro de sodio, Ácido Bórico, Agua desionizada c.s.p. 100 ml.

- **SM3**: Contenido: Solución isotónica estéril que contiene: ácido bórico, cloruro de sodio, edetato de sodio, borato de sodio y ajustadores de pH; ingredientes activos: Poloxamina 1%, HYDRANATE (Hidroxialquilfosfonato) 0,03%; DYMED (Polihexametil biguanida HCl) 0,0001 %.

En tubos eppendorf se colocaron alícuotas de 1 ml de SF (control) y de cada una de las **SM**. Se agregaron 10 µl de la suspensión de quistes de las cepas en estudio a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente por períodos de: 6 y 24 horas, 3, 7 y 14 días. Transcurridos estos tiempos de incubación con cada **SM**, se sembraron los sedimentos obtenidos en ANN según Page (1976). Las placas se incubaron a 37° C y se observaron diariamente, a partir de las 48 h de sembradas, y durante 15 días.

Se consideró que la **SM** mostraba efecto quisticida cuando no se evidenció desarrollo de las cepas incubadas.

El estudio se realizó por triplicado.

Resultados:

Los controles evidenciaron crecimiento en todos los tiempos de exposición (Fig. 3.3).

La Solución **1** (**SM1**) presentó actividad quisticida a partir del día 7 de incubación para las tres cepas.

Frente a la Solución **2** (**SM2**), los cultivos de la cepa ambiental fueron positivos hasta el día 7, y para las cepas *A. polyphaga* y *Acanthamoeba* sp., la actividad quisticida se registró a partir del tercer día de exposición, mostrando una sensibilidad semejante entre ellas.

La Solución **3** (**SM3**) presentó mayor efectividad sobre *A. polyphaga* siendo quisticida a partir de las 24 h, mientras que para las otras cepas, los quistes fueron eliminados a partir de los 7 días.

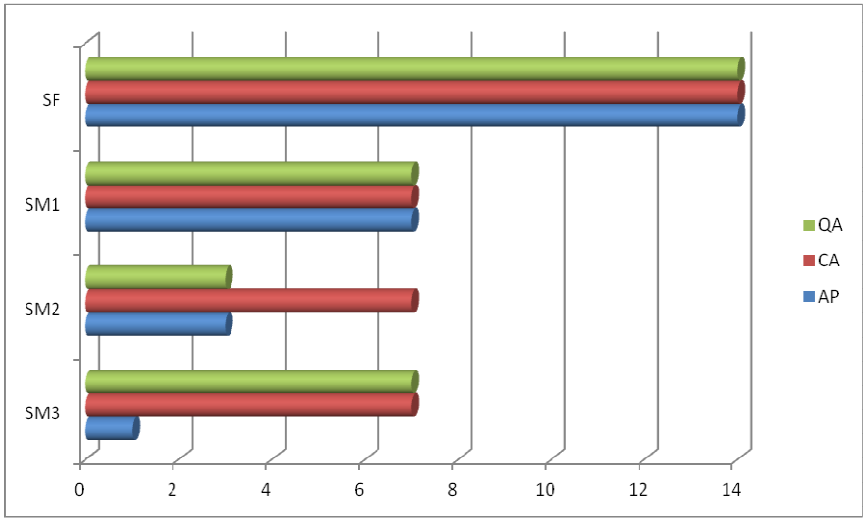


Figura 3.3: Positividad de los cultivos en función de los días de exposición a las soluciones testeadas. AP, CA y QA indican el tipo de cepa empleada (ver Materiales y Métodos)

Estos resultados muestran que los tiempos de incubación necesarios de las lentes con las **SM** para la eliminación de los quistes de estos protozoos son mucho mayores que el recomendado por los fabricantes de dichas soluciones, que es de 4 a 6 horas (Tabla 3.I).

SM	Cepas (tiempo de negativización de cultivos, días)			Tiempo recomendado por el fabricante
	AP	CA	QA	
1	7	7	7	Al menos 6h, o toda la noche
2	3	7	3	4h mínimo, 30 días máximo
3	1	7	7	4h mínimo, 30 días máximo

Tabla 3.I: Tiempos de necesarios para eliminar las cepas analizadas, comparadas con el tiempo de incubación recomendados por los fabricantes de las Soluciones Multiuso **(SM). AP, CA y QA** indican el tipo de cepa empleada (ver Materiales y Métodos).

Conclusiones:

Las diferentes cepas de *Acanthamoeba* ensayadas, permanecieron viables en los tiempos recomendados por los fabricantes de cada producto comercial. Las soluciones fueron, por lo tanto, deficientes en la eliminación de los quistes de *Acanthamoeba*, agente etiológico de QA que afecta principalmente a usuarios de lentes de contacto.

Además, las cepas estudiadas mostraron comportamientos desiguales para las soluciones testeadas. Esto podría deberse a que las soluciones multiuso presentan variaciones en su formulación, poseen distintos derivados de la Biguanida en diferentes concentraciones, lo que se traduciría en diferencias de efectividad para la eliminación de los quistes.

Según otros trabajos los líquidos comerciales más efectivos en la eliminación de quistes de *Acanthamoeba* son los que poseen peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como principio activo, y entre estos los que conocen como “sistemas de dos pasos”. Estos sistemas consisten en un primer paso de incubación de la lente con el H_2O_2 y un segundo paso de neutralización del agente (Brand y col., 1989; Hughes y col., 2001). Estos no se testearon ya que, para este trabajo, se utilizaron solo las tres marcas comerciales disponibles en ópticas de la ciudad de Bahía Blanca, lugar donde se realizó esta Tesis.

Los quistes de *Acanthamoeba* están ampliamente distribuidos en el ambiente, y es desde esta fuente que los lentes de contacto pueden contaminarse, ya sea mientras están en el

ojo, o mientras se manipulan para su colocación o conservación. *Acanthamoeba* puede hallarse sobre la lente, en los envases de las soluciones multiuso o en los estuches que se utilizan para desinfección. Teniendo en cuenta que no todas las soluciones comerciales son efectivas en su eliminación, es importante mantener estrictas normas de higiene durante el manejo y manipulación de las mismas, y conservar las soluciones comerciales que se emplean debidamente cerradas.

3.3. Resistencia de los quistes de *Acanthamoeba* frente a **soluciones de etanol**.

Introducción:

El etanol y diluciones del mismo, son ampliamente usados para la desinfección de superficies y utensilios en la práctica clínica.
Dada la distribución ambiental de *Acanthamoeba* y su rol como potencial patógeno, el **objetivo de esta sección** fue probar la actividad quisticida del etanol en la cepa patógena *A. polyphaga*, ATCC 30461

Materiales y métodos:

Se trabajó con quistes maduros de *A. polyphaga*, obtenidos de un cultivo en medio líquido MYAS, concentrados por centrifugación hasta 1,2 x 10^5 quistes/ml.
Se prepararon diluciones de etanol absoluto al 25%, 50% y 70%; se probó también la actividad del etanol al 100% (absoluto). Como testigo se utilizo solución de Page.
A 10 ml del etanol absoluto, sus diluciones y la solución control se le agregó 1ml del concentrado de quistes. Estos se incubaron por períodos de 5; 10; 20; 30 y 60 minutos; transcurrido estos tiempos se tomaron alícuotas de 1 ml que se lavaron con solución de page para eliminar los restos de etanol. El pellet obtenido se sembró en placas multiwells de 24 wells, para cultivo celular, con ANN y una suspensión de *E. coli*, según Page, 1976.

Transcurridas las 48 h se realizó la observación entre porta y cubreobjetos, considerándose con efecto quisticida positivo a las concentraciones de etanol que inhibieron el desarrollo.

Resultados:

Para la solución control se registró crecimiento en todos los tiempos testeados.
En la dilución de etanol al 25% fue la única que se evidenció crecimiento a los 5 min de exposición, siendo el resto de los tiempos y diluciones efectivas en la eliminación de los quistes de *Acanthamoeba* (Tabla 3.II).

	Crecimiento en tiempos de exposición				
Soluciones	**5 min**	**10 min**	**20 min**	**30 min**	**60 min**
Control (Page)	+	+	+	+	+
25%	+	-	-	-	-
50%	-	-	-	-	-
70%	-	-	-	-	-
100%	-	-	-	-	-

Tabla 3.II: Resultado de los cultivos según el tiempo de exposición a las distintas diluciones de etanol.

Conclusiones:

Como se mencionó anteriormente, las soluciones de etanol son una de las soluciones desinfectantes más usadas en la clínica y en el laboratorio. Se la utiliza como desinfectante

de superficies, de utensilios, y como antiséptico cutáneo previo a algunas prácticas comunes, como la extracción de sangre.

Concluimos que, si utilizamos etanol para desinfectar mesadas de trabajo u otros objetos, debemos dejarlo actuar durante más de 5 minutos si está diluido al 25%, mientras que para concentraciones mayores, la actividad quisticida se evidencia en menor tiempo.

Capitulo 4

Análisis ultraestructural de aislamientos de *Acanthamoeba* spp.

Introduccion:

Durante su ciclo de vida *Acanthamoeba* alterna entre dos estadíos bien definidos, trofozoítos y quistes. El trofozoíto es el estadío metabólicamente activo, capaz de replicarse y responsable del daño a los tejidos infectados y el quiste es el elemento de resistencia y diseminación (Oddó, 2006; Visvesvara y col., 2007).

Inicialmente los estudios sobre este género se hicieron por microscopia óptica de campo claro, lo que permitió la definición de sus características morfológicas (Volkonsky 1931; Singh 1950; Neff 1957; Page 1967).

En los trofozoítos es distintiva la presencia de acantópodos, proyecciones citoplasmáticas espinosas, núcleo único, con cromatina central esférica y vacuolas de exclusión de agua. El quiste se presenta con una doble pared característica, compuesta por exoquiste y endoquiste. Estos caracteres morfológicos fueron enunciados por Page como criterio para su ubicación taxonómica a nivel de género (Bowers y col., 1968; Byers, 1979; Page, 1976).

Posteriormente, las características morfológicas de sus quistes, se utilizaron para la clasificación de sus especies en tres Grupos (Pussard y col., 1977).

En cuanto a la ultraestructura de los diferentes estadios de *Acanthamoeba*, los principales estudios se realizaron en la década del 60' por Bowers y Korn (1968; 1969), quienes describieron sus caracteres estructurales. Más recientemente se han realizado estudios estructurales de los procesos de enquistamiento y desenquistamiento de *Acanthamoeba* (Lloyd y col., 2001; Chávez-Munguía y col., 2005; 2007).

El objetivo de este capítulo fue realizar el análisis morfológico y ultraestructural al Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) de cepas de *Acanthamoeba* spp., aisladas en la ciudad de Bahía Blanca.

Materiales y Métodos

Cepas de *Acanthamoeba*: se trabajó con el cultivo de una cepa ambiental asilada en nuestro laboratorio de una piscina cubierta, y una cepa aislada de un paciente con queratitis producida por este protozoo, ambas en la ciudad de Bahía Blanca, Argentina, las cuales fueron clasificadas morfológicamente como perteneciente al género *Acanthamoeba*, Grupo II. La ubicación genérica fue confirmada mediante PCR según los protocolos publicados por Schroeder y col., 2001 y Booton y col., 2002. Se utilizó el par **JDP1** (5´-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3´) / **JDP2** (5´-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3´), específicos para el género *Acanthamoeba* (Ver Capitulo 6: Tipificación molecular de los aislamientos de AVL).

La cepa se repicó en medio líquido MYAS (Malt extract-Yeast extract-Amoebae Saline: extracto de maltosa 0,1 gr, extracto de levadura 0,1 gr y solución de Page csp. 1000 ml) con una suspensión de *Escherichia coli*. Se incubó durante 2 meses a 37 °C para la obtención de quistes maduros.

Para el procesamiento de los quistes se tomó una alícuota de 20 ml de este cultivo. Para estudiar los trofozoítos, 48 h antes de procesar las muestras para TEM, se tomó una alícuota de 20 ml en frasco estéril y se le agregó una suspensión de bacterias para inducir el desenquistamiento.

Microscopía electrónica

La técnica detallada de preparación de muestras para el examen al Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) adaptada para AVL desde Costamagna y col., (1996) y Costamagna y Prado Figueroa (2001) fue:

Las alícutas de 20 ml de los concentrados de quistes y de trofozoítos en medio MYAS, se centifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos y se descartaron los sobrenadantes

El sedimento se fijó con igual volumen de Glutaraldehído al 5% en Page, quedando de esta manera una concentración del 2,5%. El material fijado permanecio en la heladera, a 4°C, durante 24 h.

A partir de este momento y hasta el final de la deshidratación el procesamiento se realizó a 4°C.

Luego de la fijación se procedió al lavado de la muestra con Page para eliminar el Glutaraldehído, este lavado se repitió dos veces. El lavado de la muestra durante este procedimiento se realizó por centrifugación durante 5 min a 300 rpm.

Posteriormente se realizó la post-fijación con OsO_4 al 1% en buffer fosfato 0,05M, pH 7,2.

Se descartó el sobrenadante con pipeta automática y se repitió el procedimiento dos veces.

A continuación se lavó dos veces con Page y luego se realizó un nuevo lavado con buffer maleato 0,05 M, pH 5,0.

Posteriormente se colocó en solución de acetato de uranilo al 0,5% en buffer maleato, durante 20 min. Se renovó el acetato de uranilo cada 20 min hasta completar las dos horas.

Luego se lavó dos veces con buffer maleato, y se procedió a la deshidratación con etanol en graduaciones crecientes (25, 50 y 75% en buffer maleato) dos veces con cada graduación, durante 20 min cada uno.

A continuación de dejo durante 24 h a 4°C.

Posteriormente se descartó el alcohol y se realizó un paso final de deshidratación con etanol absoluto para realizar la imbibición en resina Spurr.

La imbibición en la resina se realizó a temperatura ambiente según el esquema siguiente:

-Una parte de resina más tres partes de etanol, goteo durante media hora.

-Dos partes de resina más dos de etanol, goteo durante media hora.

-Tres partes de resina y una de etanol, goteo durante media hora.

El tubo se dejó destapado toda la noche, y luego se colocó resina al 100 %.

-A continuación se distribuyó en capsulas Beem las que se colocaron en estufa a 60°C durante 12 h para su polimerización.
-Posteriormente se realizó la ultramicrotomía: Cortes ultrafinos de 100 micrones se recogieron sobre grillas de cobre de 200 Mesh y fueron contrastados con una solución acuosa de Acetato de uranilo al 3% durante aproximadamente 40 min, y con citrato de plomo pH: 11,2 durante 10 min.
-Las observaciones se realizaron en el laboratorio de Microscopía Electrónica del INIBIBB, CONICET Bahía Blanca, con un Microscopio Electrónico de Transmisión marca JEOL modelo 100 CXII a 80 Kv.
-Las microfotografías se tomaron con SO-163 Kodak electron Image-film.

Resultados

La emisión de seudópodos y acantópodos hace que el contorno del trofozoíto sea irregular (Fig. 4.1: a-e), lo que resulta en una amplia variabilidad de formas y tamaños tanto en las observaciones en fresco como al TEM (Fig. 4.6-4.8).
En las microfotografías al TEM se registraron trofozoítos de 4,3 a 11 µm de diámetro.
En la masa citoplasmática se destacan dos zonas: **citoplasma hialino, cortex o ectoplasma**, adyacente a la membrana plasmática, que contiene filamentos, y pequeños elementos formes, como gránulos, ribosomas libres, pequeñas vesículas; y el **endoplasma** compuesto por la porción de citoplasma más interna que contiene todas las organelas y vacuolas de mayor tamaño (Bowers y col., 1968) (Fig. 4.1: b, 4.5-4.7).

En el endoplasma encontramos:
- Materiales de reserva energética, como gotas de aspecto lipídico (GL) y gránulos de glucógeno (Glu).
Los lípidos se almacenan como gotas dispersas en el citoplasma, de 0,2 a 0,85 µm de diámetro, sin que estén rodeadas de membranas. Pueden presentarse agrupadas (Fig. 4.1:

a). El glucógeno puede observarse mayoritariamente como gránulos simples o formando rosetas (Fig. 4.1: e y 4.7).

-Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), puede verse rodeando el endoplasma (Fig. 4.1: b). Se ha documentado la presencia del retículo endoplasmático liso (REL) en el citoplasma del trofozoíto de *Acanthamoeba*, pero es difícil de distinguir debido al amplio contenido de pequeñas vesículas (Bowers y col., 1968).

-Vacuolas digestivas (VD), derivan del proceso de endocitosis, en su interior es posible observar material ingerido en diferente grado de descomposición. Su tamaño varía entre los 0,2µm a 1,7 µm de diámetro (Fig. 4.1: a-d, 4.5-4.8).

-Vacuolas de exclusión de agua (VEA), se distinguen de la anterior por su contenido límpido. Pueden observarse de diferentes tamaños, menores a 0,1 µm a 2,7 µm y distribuidas por todo el endoplasma (Fig. 4.1: a, b y c).
Su función es la de mantener la osmolaridad celular. Estas VEA se observan rodeadas por un sistema de túbulos y vesículas, denominado espongioma (Fig. 4.1: c), encargado del drenaje de agua hacia la vacuola central. La apertura de este sistema en la VEA hace que su contorno se vea irregular y que la membrana que la rodea parezca interrumpida (Bowers y col., 1968).

- Numerosas mitocondrias (Mit), de 0,1 µm a 1,2 µm de diámetro pueden observarse, redondas o esféricas, algunas rodeando la VEA (Fig. 4.1: a-e, 4.6-4.8).

-Núcleo (N); se observa un núcleo único, de 1,9 µm a 3,8 µm de diámetro, con un nucléolo compacto central y esférico de 1,4 µm a 1,9 µm; estas son características distintivas del género (Fig. 4.1: a y d, 4.8).

A mayor aumento es posible observar la membrana nuclear, compuesta por un sistema de dos membranas fusionadas en los puntos en que se forman los poros nucleares (Fig. 4.1: a, recuadro).

- Complejo de Golgi (G), posee la forma cisternal típica de este sistema de membranas, formado por 3 a 5 cisternas que se dilatan en sus extremos (Fig. 4.1: b).

Como en la mayoría de los protozoos, en *Acanthamoeba,* la ingestión de alimentos se realiza por fagocitosis. En este proceso, extensiones del citoplasma rodean a la partícula que será ingerida (Fig. 4.1: e) y cuando estas extensiones se fusionan se forma una vacuola rodeada de membrana plasmática que se internalizan en el citoplasma, originando las vacuolas digestivas. Estas vacuolas posteriormente se fusionan con los lisosomas, trasportadores de enzimas digestivas, y se inicia la digestión de la partícula fagocitada. En la Fig. 4.1: d, círculos, se observan bacterias en contacto con el citoplasma, las que probablemente serán ingeridas, y una serie de vacuolas digestivas con material en distinto grado de descomposición. Además se pueden visualizar bacterias sin digerir.

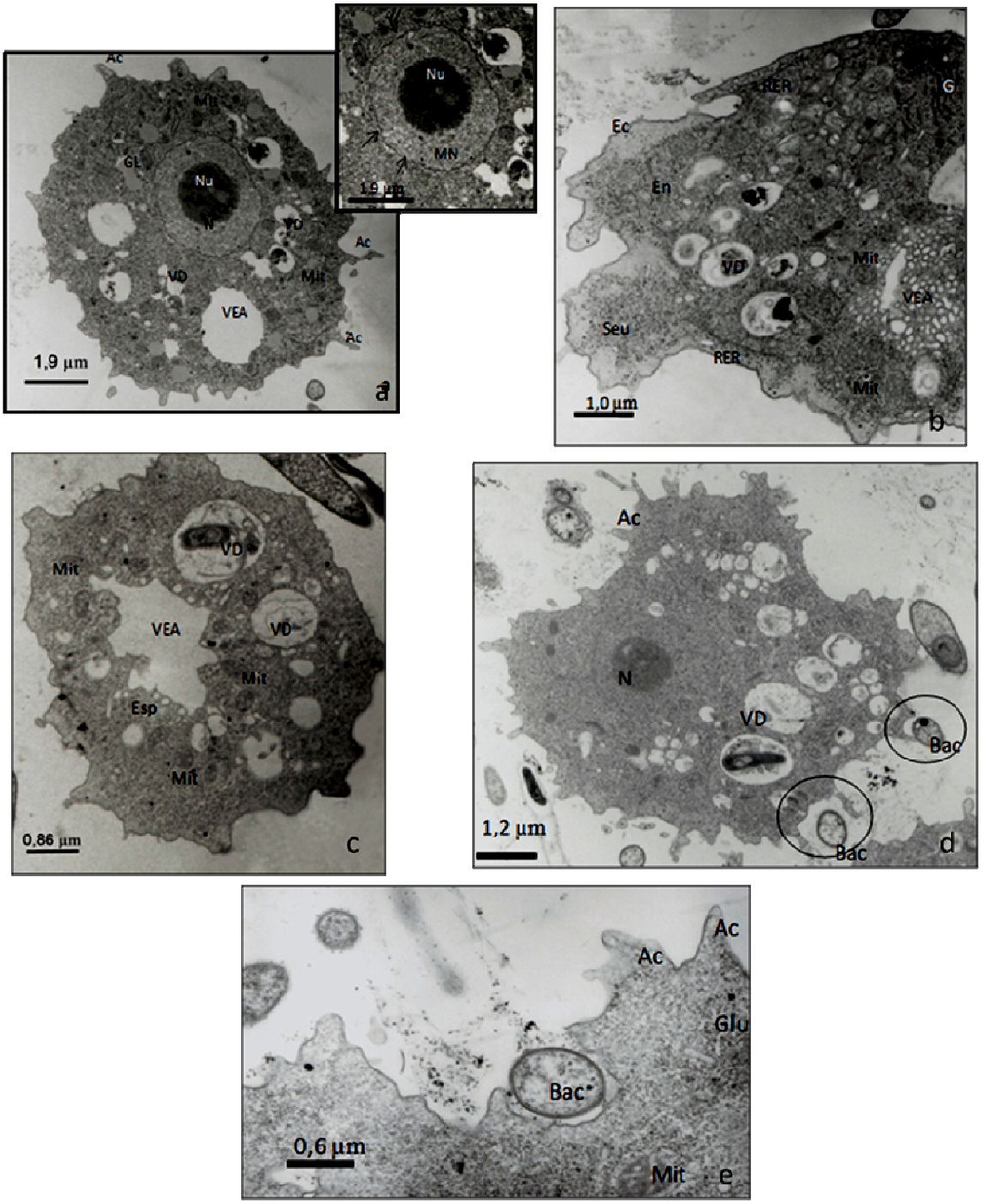


Figura 4.1: Trofozoítos de *Acanthamoeba* por TEM. Ac: acantópodos, Mit: mitocondrias, GL: gotas de lípidos, VD: vacuolas digestivas, VEA: vacuolas de exclusión de agua, MN: membrana nuclear, N: núcleo. Nu: nucléolo, G: complejo de Golgi, Ec: ectoplasma, En: endoplasma, Seu: seudópodo, RER: retículo endoplasmático rugoso, Esp: Espongioma, Bac: bacterias, Glu: glucógeno.

Ante una situación de stress, como cambios en la osmoralidad del medio, alteración del pH, variaciones de temperatura o falta de alimento, *Acanthamoeba* dispara un mecanismo de diferenciación que concluye con la formación del quiste. Básicamente, este proceso consiste en una deshidratación con reducción del volumen celular y eliminación de material celular innecesario para el quiste (Bowers y col., 1969; Lloyd y col., 2001; Gutiérrez y col., 2001).

Inicialmente se produce la reabsorción de seudópodos y acantópodos, con lo que la célula se redondea dando origen al prequiste. Alrededor del mismo, se forma una capa amorfa (Fig. 4.2: a y b, 4.9), aparentemente constituida por proteínas y secretada por vesículas provenientes del aparato de Golgi, que en el quiste maduro forma el exoquiste (Bowers y col., 1969; Chávez-Munguía y col., 2005; Chavéz-Munguía y col., 2007). Durante el enquistamiento se forman los autofagosomas, con la función dual de eliminar material celular en exceso y de proveer energía para la maduración del quiste (Fig. 4.2: a y 4.9) (Gutiérrez y col., 2001).

Como resultado de este proceso de diferenciación se obtiene el elemento de resistencia que es el quiste maduro, con un diámetro de 4,1 µm a 8,9 µm. Este está rodeado por una doble pared compuesta por el exoquiste, de 0,1 a 0,3 µm de grosor, más externo y el endoquiste, de 0,06 a 0,2 µm, más interno (Fig. 4.2: c-e, 4.3; 4.10-4.12).

El exoquiste posee una estructura de múltiples capas construida aparentemente por lípidos, proteínas y carbohidratos. En contraste el endoquiste es de naturaleza fibrosa, compuesto principalmente por celulosa (Bowers y col., 1969; Neff y col., 1964).

Entre las dos paredes que conforman el quiste maduro se observa un espacio, de 0,35 a 2,2 µm, que solo es interrumpido en los puntos en que se forman los ostiolos. Se observa, también, un espacio bien definido entre la pared interna del quiste, el endoquiste, y la membrana plasmática, este es de 0,06 a 0,1 µm (Fig. 4.2: c, 4.3; 4.4 y 4.15).

El ostiolo, con un diámetro de 1,6 a 2,4 µm, es un espacio libre de pared quística que sirve de puerta de salida al trofozoíto naciente y permite el monitoreo del medio externo para conocer en qué momento iniciar el desenquistamiento (Fig. 4,2: e, 4.4, 4.13 y 4.14) (Khan, 2006; Chávez-Munguía y col., 2005).

Según las imágenes (Fig. 4.2: e y 4.4), en un punto se fusionan exo y endoquiste para delimitar un espacio libre de pared, aunque la capa mas externa del exoquiste se continúa sobre esta zona que en el centro está ocupada por el opérculo, una porción de 0,8 a 1,3 µm de diámetro de ambas capas fusionadas, que actúa a modo de tapón (Fig. 4.13 y 4.14) (Bowers y col., 1969).

En su citoplasma el quiste conserva las organelas del trofozoíto, además de algunos autofagosamas de la etapa pre-quística inmersos en un citoplasma más denso (Fig. 4.2: d, 4.10; 4.11 y 4.16).

Las VEA se destacan por su contenido límpido en el citoplasma condensado, observándose colapsadas y rodeadas de pequeñas vesículas. Las mitocondrias, de 0,2 a 0,8 µm, se observan reducidas en tamaño pero conservando su estructura, solo que con una matriz mucho más densa (Fig. 4.2: c-e). Núcleo y nucléolo también reducen su tamaño, en el quiste sus diámetros son de 2,4 µm y 1,1 µm, respectivamente (Fig. 4.2: d, 4.3: b, 4.11 y 4.15).

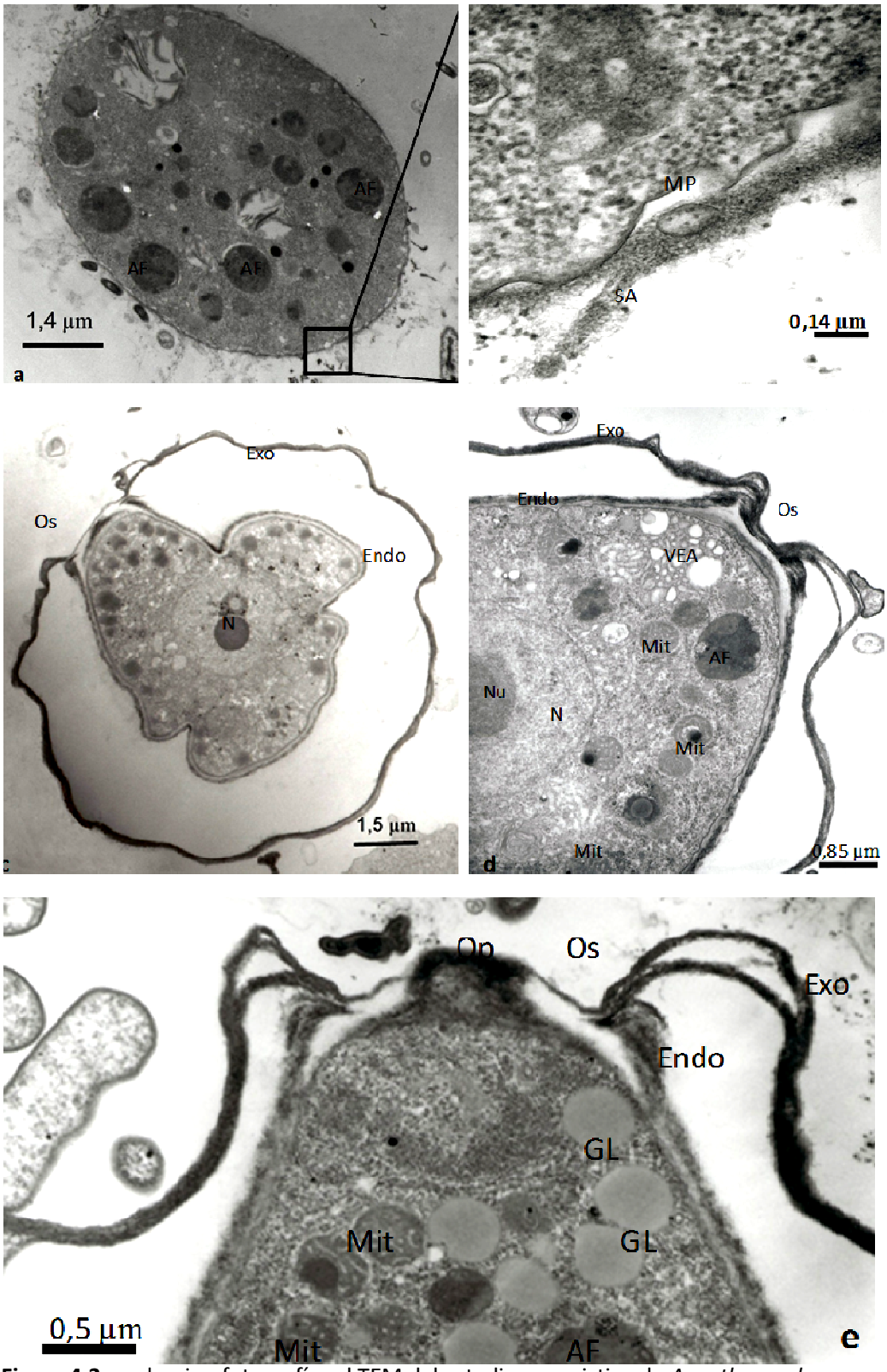


Figura 4.2: a y b microfotografías al TEM del estadio prequistico de *Acanthamoeba*. c-e Quistes maduros de *Acanthamoeba* al TEM. AF: autofagosomas, MP: membrana plasmática, SA: sustancia amorfa, Exo: exoquiste, Endo: endoquiste, Os: ostiolo, VEA: vacuola de exclusión de agua, Mit: mitocondrias, N: núcleo, Nu: nucléolo, GL: gotas de lípidos, Op: opérculo.

En los trofozoítos de *Acanthamoeba* la locomoción se realiza por la emisión de seudópodos hialinos (Khan, 2006). Además, desde su superficie se forman subseudópodos, tipo filópodos: proyecciones ectoplasmáticas espinosas, denominados acantópodos, derivado del griego *acanth*: aguja, que es lo que le da nombre al género (Khan, 2009; Alsan y col., 2005). Como muestran las imágenes obtenidas en nuestro trabajo, ésto resulta en una amplia variabilidad de formas y tamaños en el trofozoíto.

Estas prolongaciones citoplasmáticas intervienen también en la captura del alimento y su posterior endocitosis, y en la adhesión de la ameba a células hospedadoras u otras superficies (Chambers y col., 1972).

Estructuralmente la membrana plasmática de *Acanthamoeba* es igual a la de otras células eucariotas.

En nuestras micrografías se pudieron observar que numerosas mitocondrias rodean las VEA.

Otras micrografías (TEM) que ilustran de manera más completa lo ya expresado

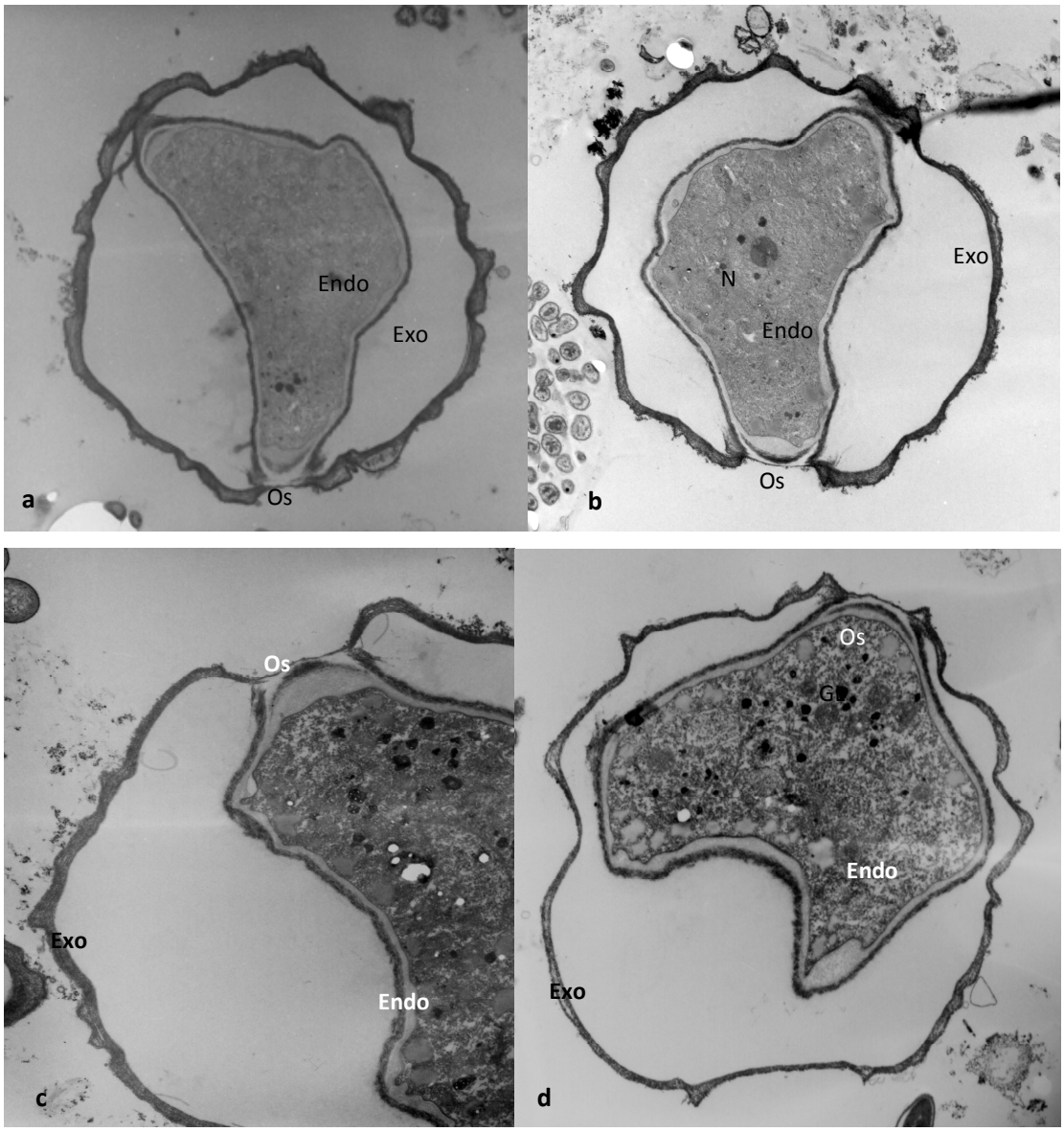


Figura 4.3: a-dQuistes TEM. 5000 aumentos; se observa exoquiste (Exo), endoquiste (Endo), ostiolo (Os) y núcleo (N) (solo en b).

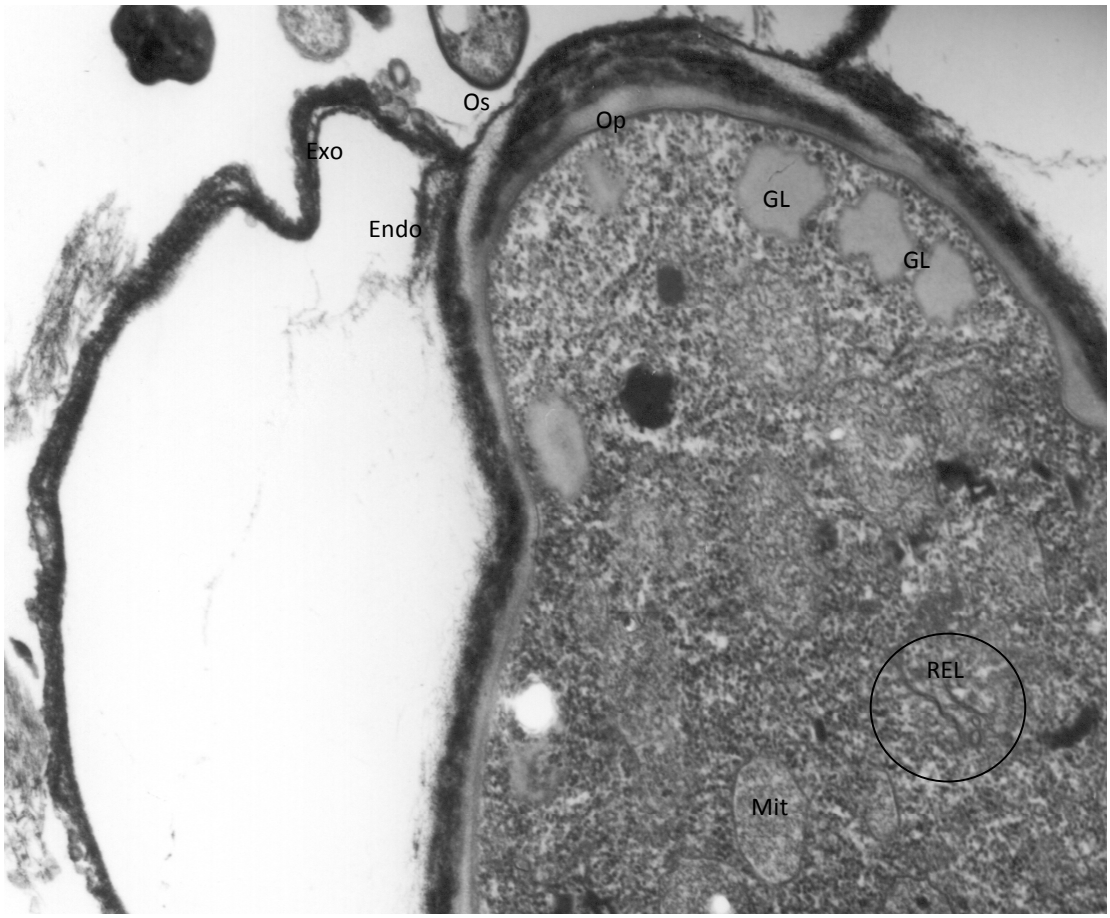


Figura 4.4: Quiste a 6100 aumentos. En el interior del quiste, podemos visualizar gotas de lípidos (GL), mitocondrias (Mit) y una porción de retículo endoplasmatico liso (REL). Exoquiste (Exo), endoquiste (Endo), Ostiolo (Os) y Operculo (Op)

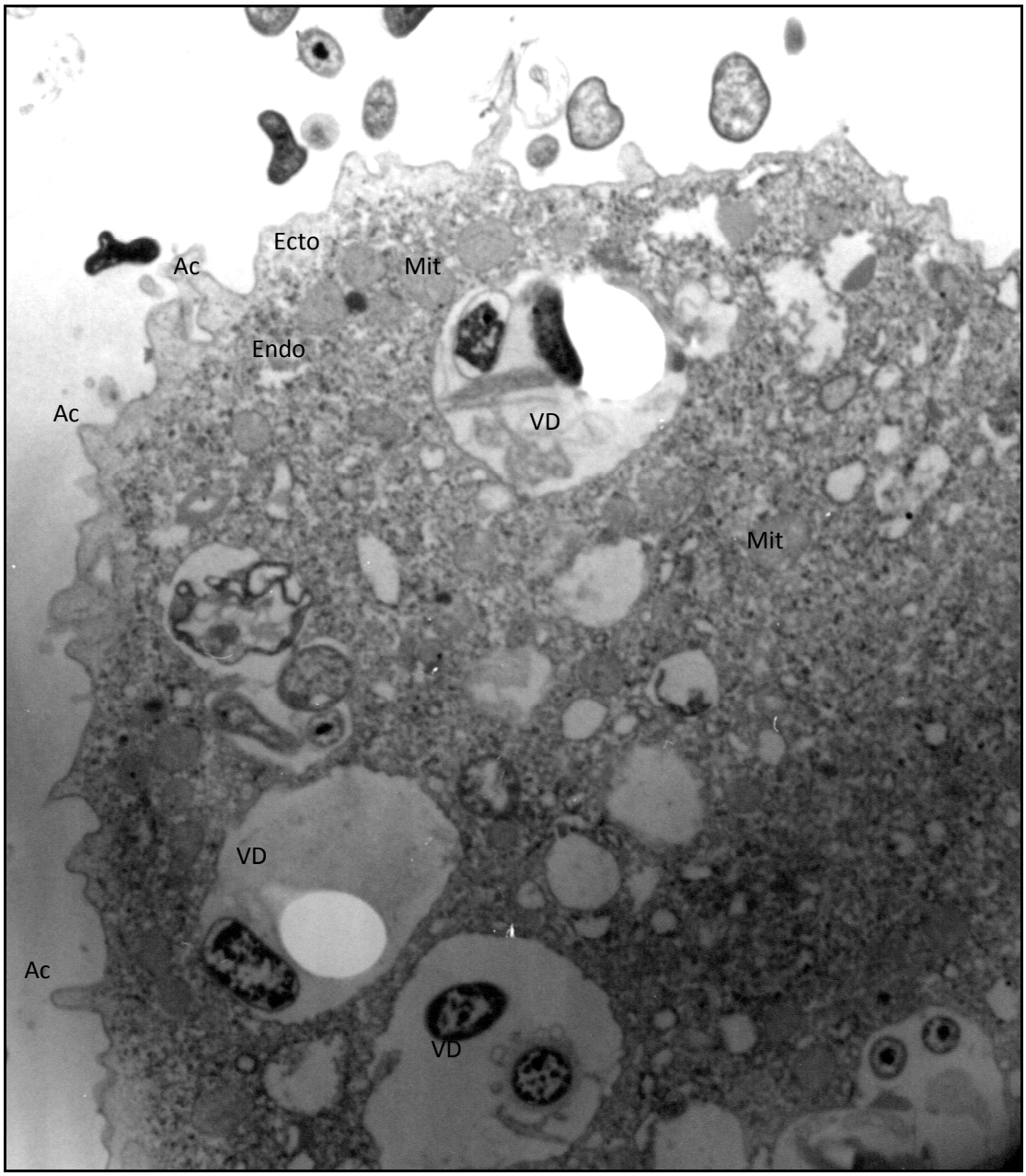


Figura 4.5: Trofozoíto de *Acanthamoeba* sp., tomada a 5000 aumentos, que muestra: acantópodos (Ac), ectoplasma (Ecto), endoplasma (Endo), vacuolas digestivas (VD) con material en distinto grado de descomposición, numerosas mitocondrias (Mit) en el citoplasma.

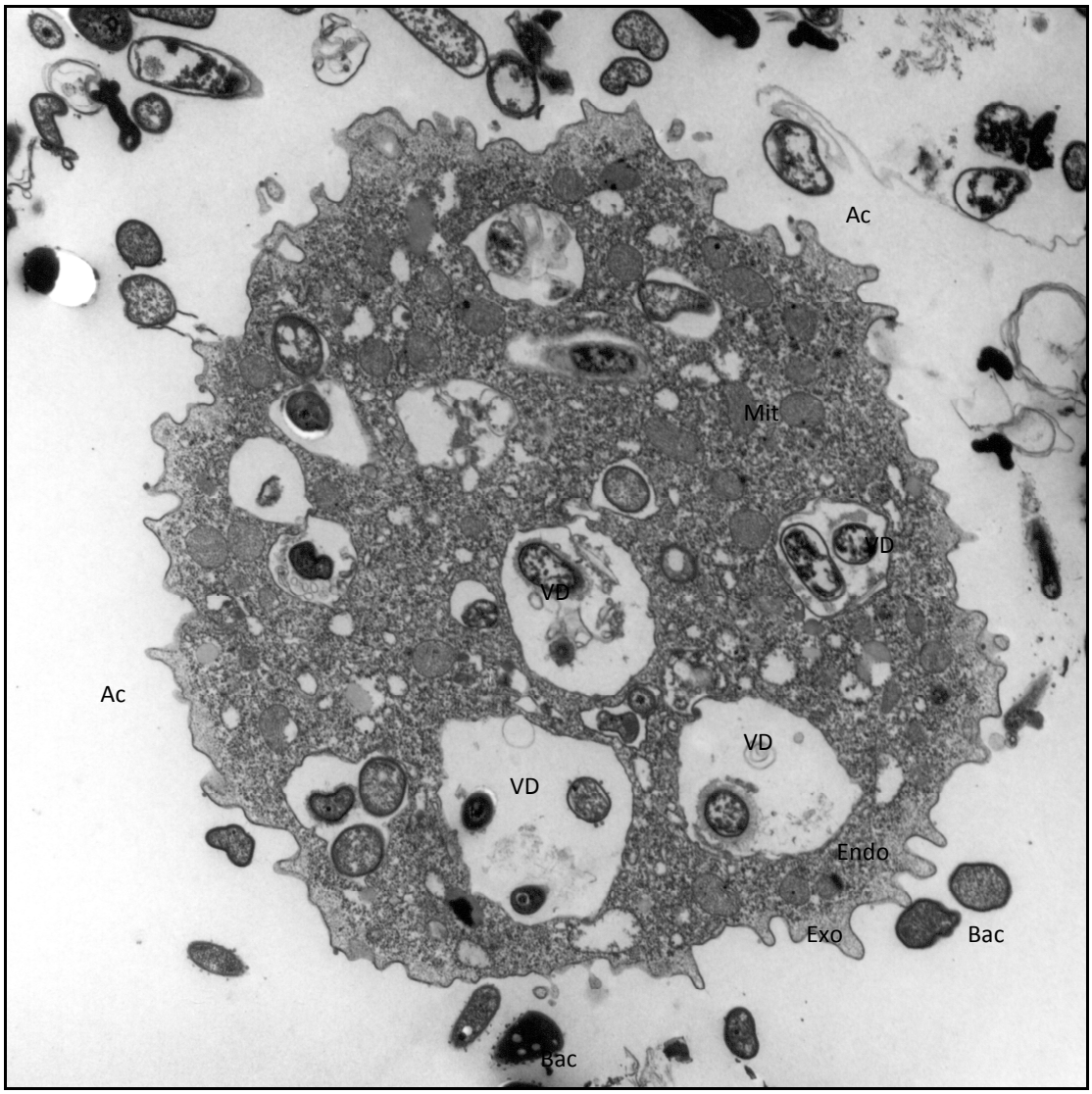


Figura 4.6: Trofozíto, a 5000 aumentos, que muestra: Acantópodos (Ac), exoplasma (Exo), endoplasma (Endo), numerosas mitocondrias (Mit), vacuolas digestivas (VD) de diferentes tamaños, con contenido en distinto grado de descomposición en su interior. En el exterior bacterias (Bac).

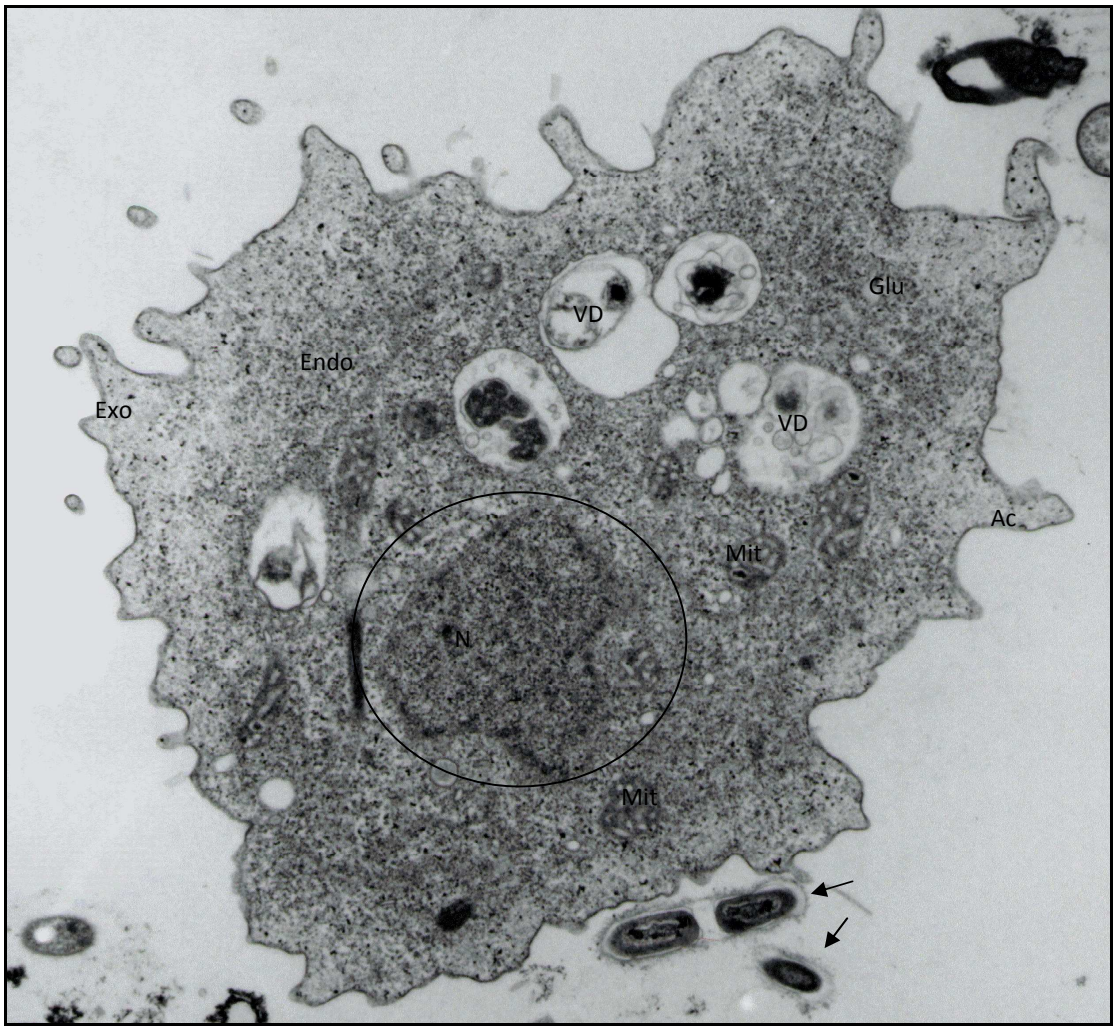


Figura 4.7: Trofozoíto a 5000 aumentos donde se observan: Acantópodos (Ac), exoplasma (Exo), endoplasma (Endo), gránulos de glucógeno (Glu), mitocondrias (Mit), vacuolas digestivas (VD). Se distingue, aunque con poca claridad, una parte del núcleo (N) (círculo). En el exterior, bacterias (Flecha).

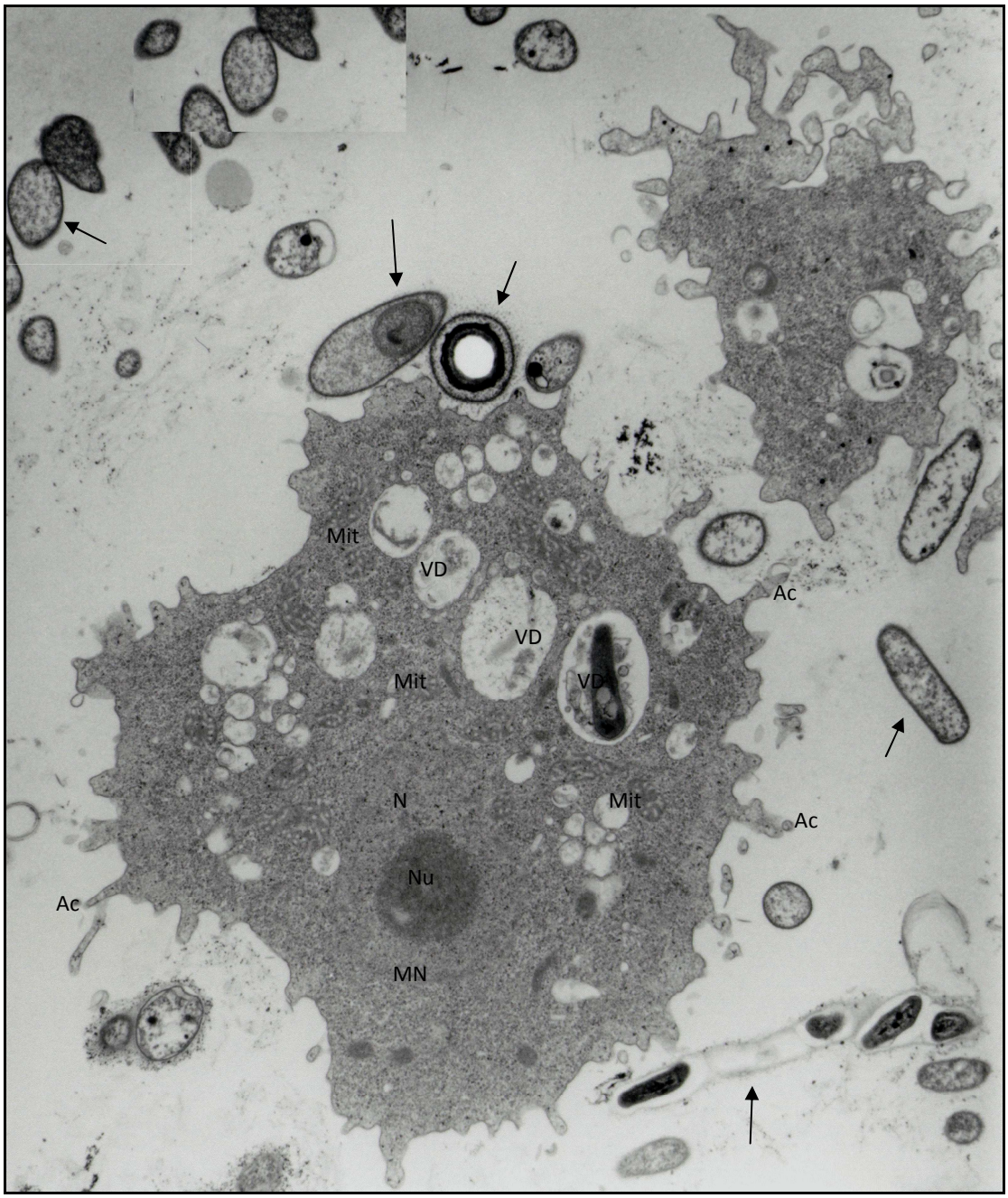


Figura 4.8: Micrografía mostrando dos trofozoítos, de diferentes tamaños, a 5000 aumentos, donde se visualizan: acantópodos (Ac), numerosas vacuolas digestivas (VD) y mitocondrias (Mit). Núcleo (N), rodeado de membrana nuclear (MN), con nucléolo (Nu) central y esférico y en el exterior bacterias (Flechas).

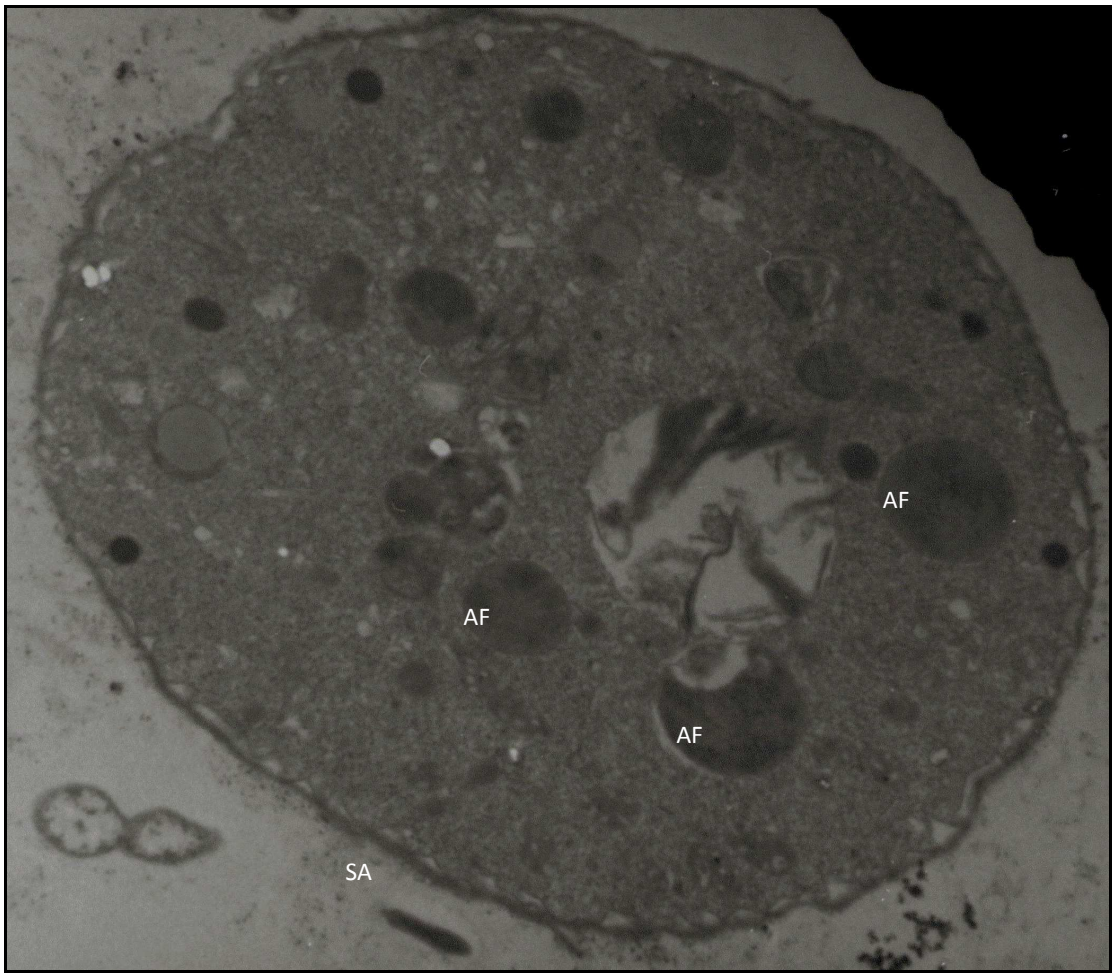


Figura 4.9: Micrografía de un prequiste a 5000 aumentos: puede observarse la sustancia amorfa (SA) que dara origen al exoquiste, y numerosos autofagosamas (AF), inmersos en el citoplasma de la celula en proeceso de enquistamiento.

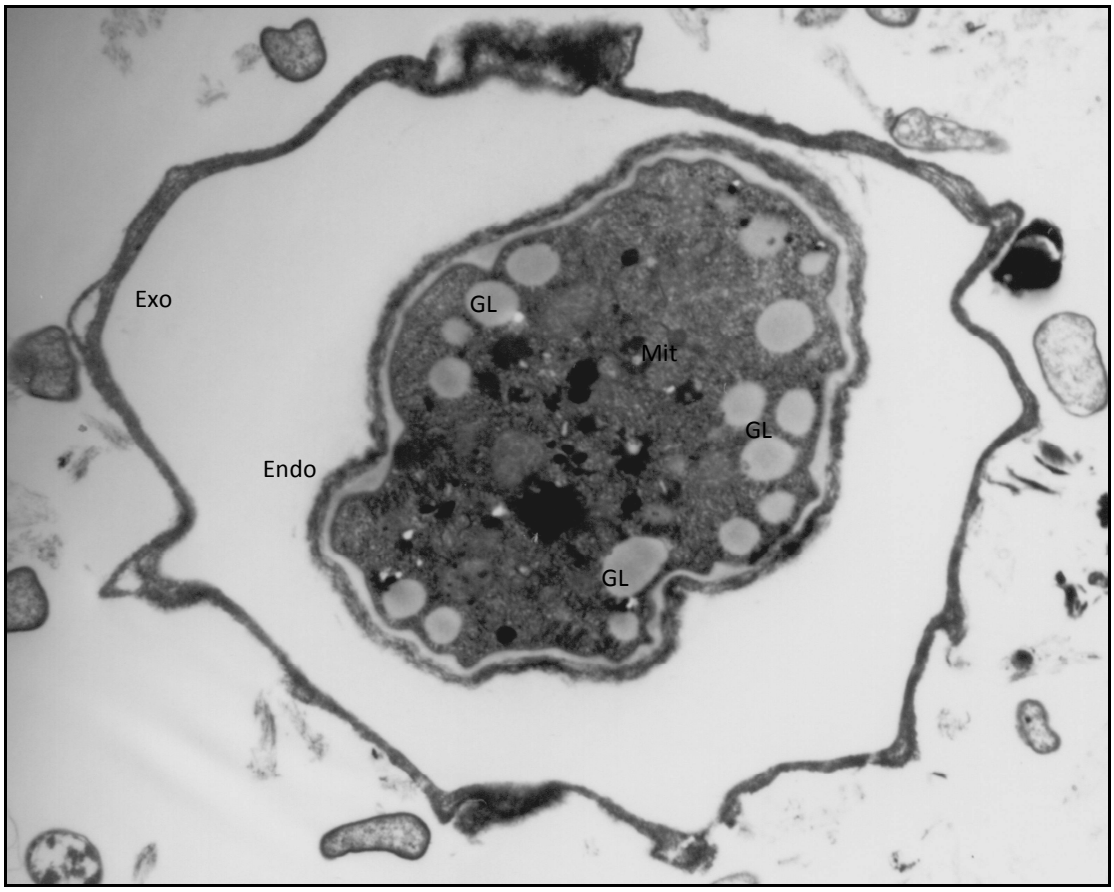


Figura 4.10: Quiste a 6700 aumentos. Se visualizan numerosas gotas de lípidos (GL), ubicados en la periferia del trofozoíto que está en el interior. No se observan ostiolos. Exoquiste (Exo), endoquiste (Endo), y algunas mitocondrias (Mit).

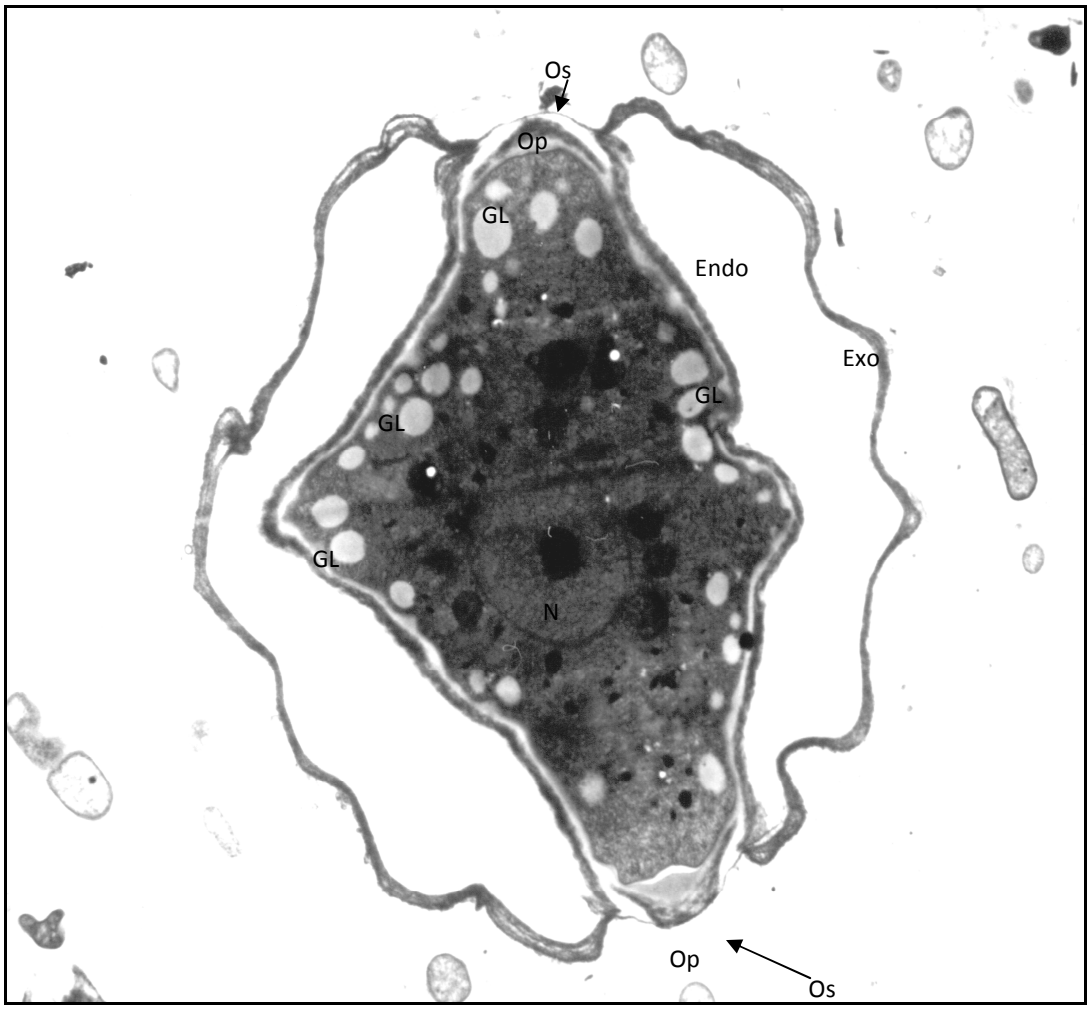


Figura 4.11: Quiste a 5000 aumentos. Gran cantidad de gotas lípidos (GL) adyacentes al endoquiste (Endo), núcleo (N) y nucléolo (Un) y presencia de dos ostiolos (Os) con opérculos (Op).

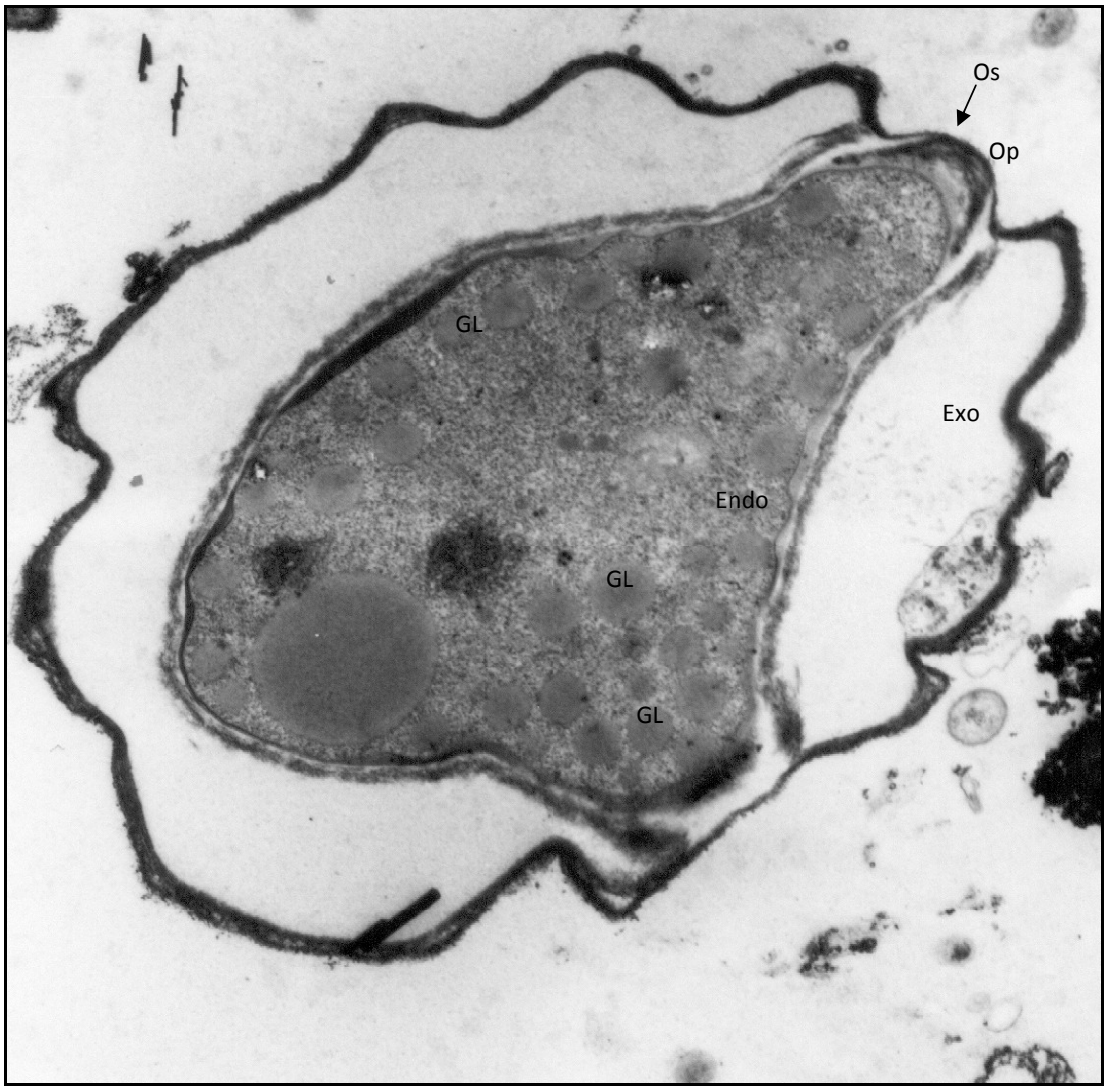


Figura 4.12: Quiste a 5000 aumentos. Al igual que la imagen anterior, se observa gran cantidad de gotas de lípidos (GL).

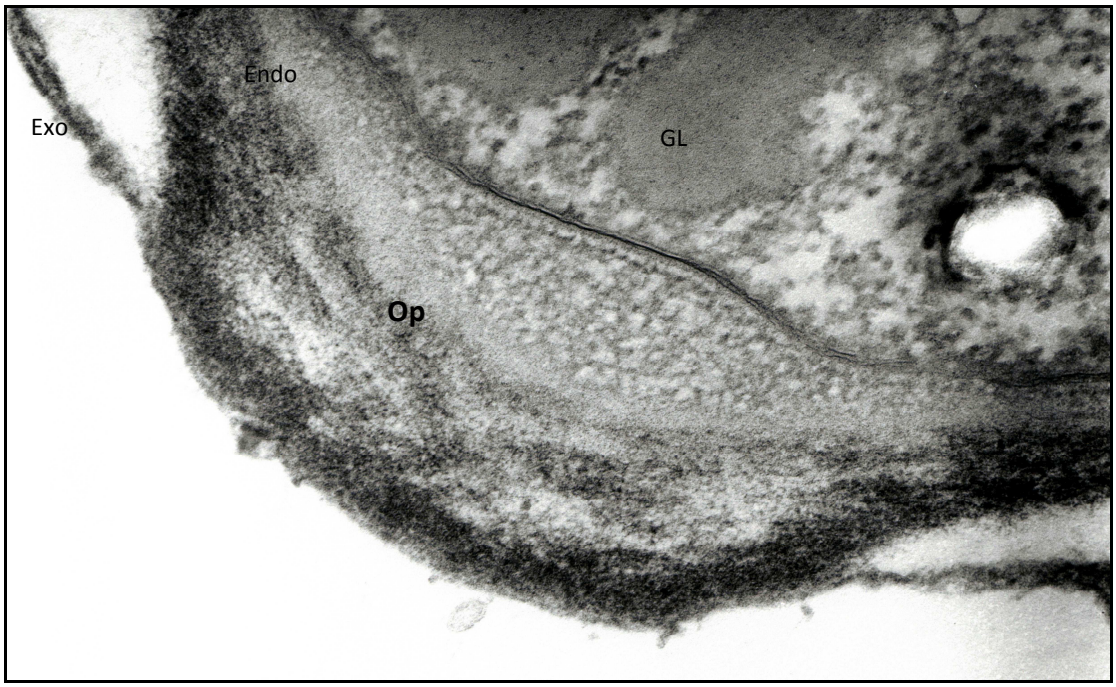


Figura 4.13: En esta micrografía puede visualizarse, a gran aumento (50.000) el opérculo: formado por la fusión de exo y endoquiste, ubicado en el centro del ostiolo, en donde actúa a modo de tapón. Op: opérculo, Endo: endoquiste, Exo: exoquiste, MP: membrana plasmática, GL: gotas de lípidos.

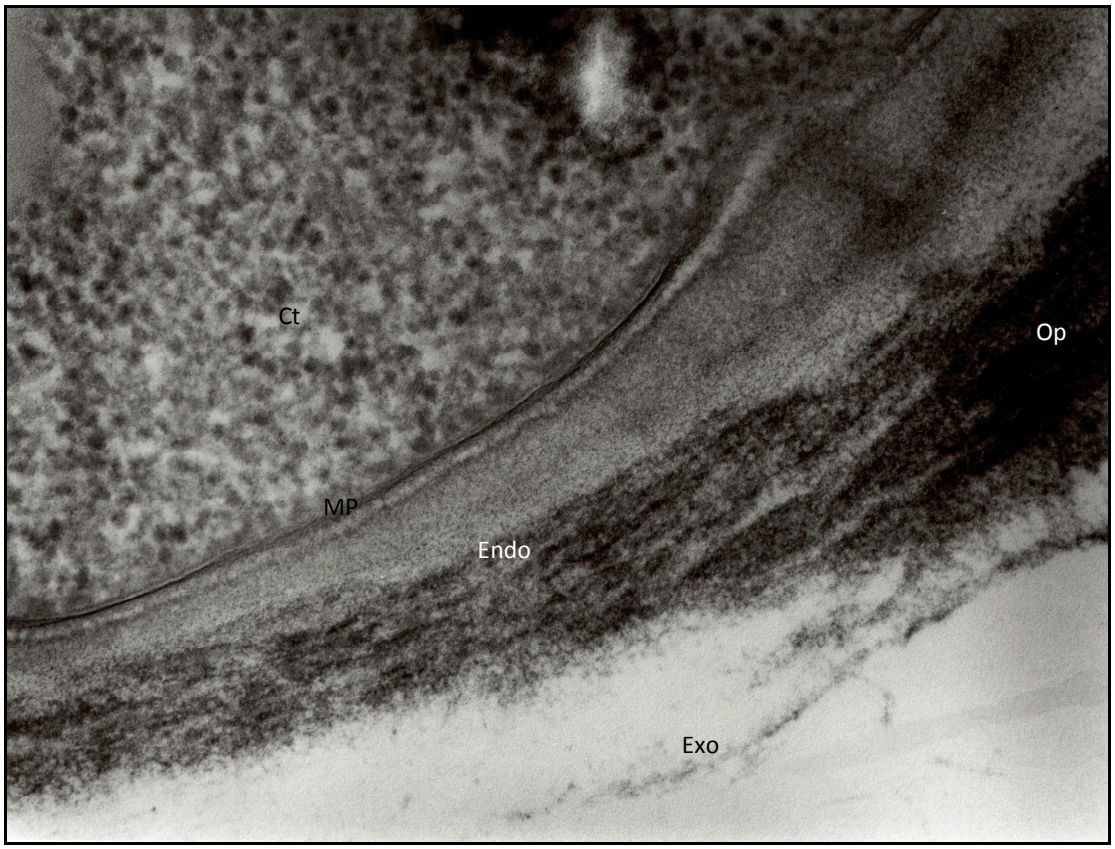


Figura 4.14: Opérculo a mayor magnificación (670.000 aumentos). Op: opérculo, Endo: endoquiste, Exo: exoquiste, MP: membrana plasmática, Ct: Citoplasma.

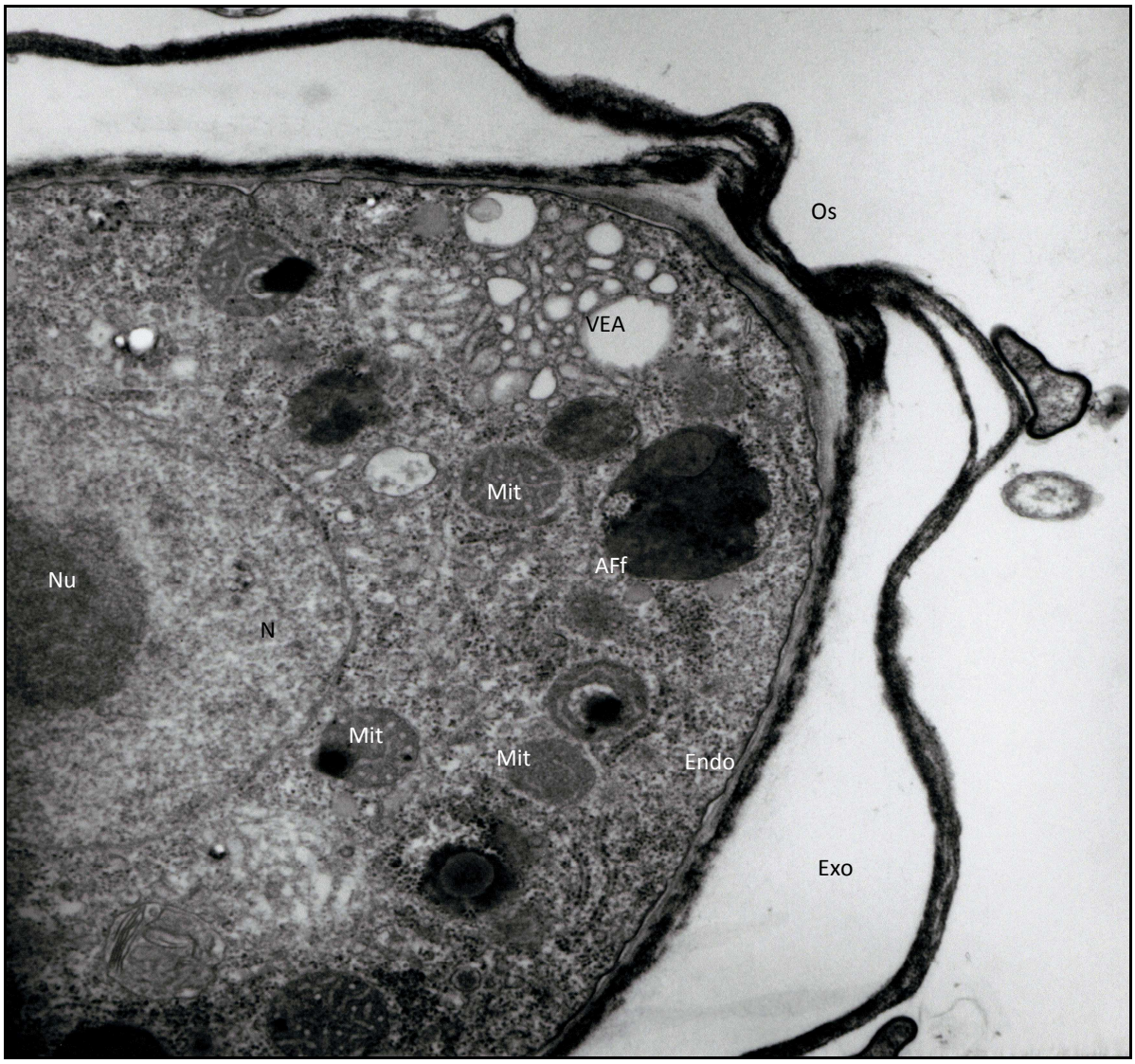


Figura 4.15: Micrografía 2 d a mayor magnificación. Exoquiste (Exo), Endoquiste (Endo), Ostiolo (Os), Miticondrias (Mit), Autofagosomas (AF), vacuola de exclusión de agua (VEA), Nucleo (N) y Nucleolo (Nu).

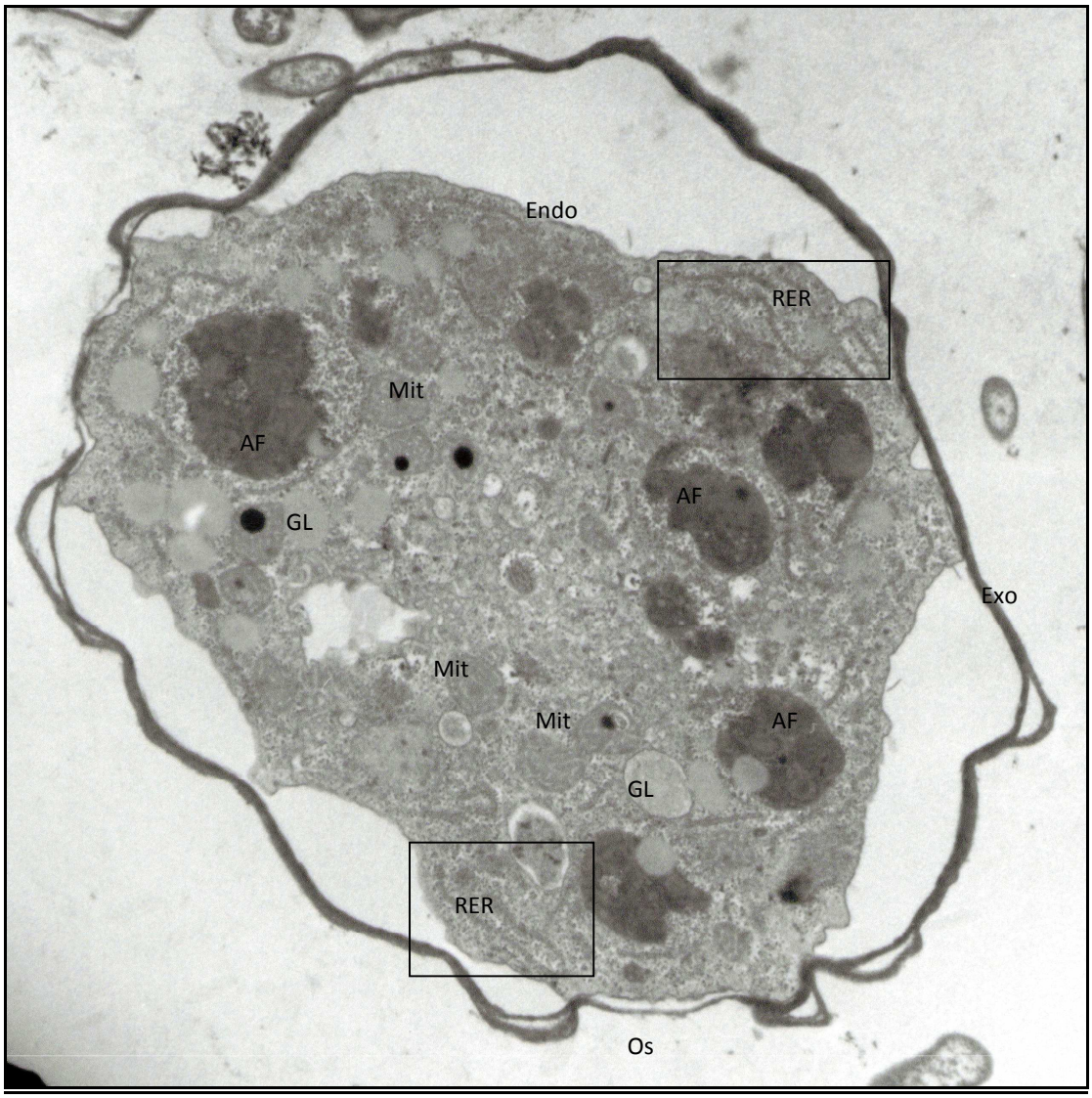


Figura 4.16: Quiste, a 5000 aumentos, donde se visualizan: Exoquiste (Exo), endoquiste (Endo), ostiolos (Os), mitondrias (Mit), gotas de lípidos (GL), y autofagosomas (AF). En algunos sectores se pueden observar porciones del Retículo Endoplásmico rugoso (RER) (recuadros)

Discusión y conclusiones

El análisis de las microfotografias confirma los resultados de Bowers & Korn (1968; 1969), demostrando que la ultraestructura de los trofozoítos de *Acanthamoeba* no difieren significativamente de la de otras células eucariotas.

El quiste representa el elemento de resistencia y diseminación. Su doble pared actúa como una barrera impermeable que aisla y protege al protozoario, permitiendole mantener su viabilidad aún en condiciones adversas.

Como ya se señaló, se conoce que la salida del trofozoíto se produce a través de ostiolo y con remoción del opérculo (Chamber, 1972). En esta parte del estudio, demostramos que la técnica modificada por Costamagna, y col., 2001 para el procesamiento de protozoos para la observación por MET es adecuada para el estudio de *Acanthamoeba* sp., en todos sus estadíos.

El estudio del proceso de enquistamiento y desenquistamiento, tanto ultraestructural como molecular, permitiría conocer estados o etapas de mayor vulnerabilidad de *Acanthamoeba* para lograr tratamientos efectivos que conduzcan a la resolución favorable de los casos clínicos.

Capítulo 5

Presencia de Trehalosa en *Acanthamoeba* spp.

Introducción:

Durante el proceso de enquistamiento varios protozoarios acumulan en su interior disacáridos, como trehalosa y sacarosa, los que serían los responsables de aportar a los mismos tolerancia a distintas situaciones de estrés (Gutiérrez y col., 2001).

La trehalosa (Fig 5.1) es un disacárido no reductor que puede ser sintetizado por bacterias, hongos, plantas e insectos, pero no por mamíferos (Avonce y col., 2006). Se ha demostrado que la presencia de trehalosa en las células las protege frente a daños producidos por la desecación, cambios de temperatura, shock osmótico y oxidación (Behm 1997; MacIntyre y col., 2007).

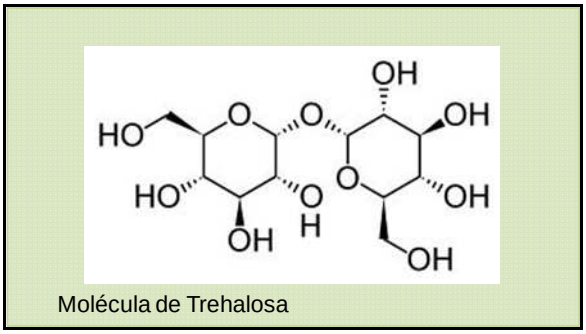


Figura 5.1: Estructura molecular de la trehalosa.

En 1980 Deslauriers y col demostraron que la trehalosa era el único disacárido presente en los quistes de *Acanthamoeba castellanii*. Este carbohidrato también está presente en el trofozoíto, pero solo representa el 10 al15% del total de los azúcares.

En *Cryptococcus neoformans* la síntesis de trehalosa es esencial para que este patógeno sobreviva dentro del hospedador; las cepas en las que esta síntesis está bloqueada pierden su virulencia en animales de experimentación (Petzold y col., 2006).

El contenido de trehalosa en distintos organismos se ha testeado principalmente por métodos enzimáticos, cromatográficos y por tinciones específicas para carbohidratos.
El único reporte existente de los niveles de trehalosa en *Acanthamoeba* se realizó por Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Deslauriers y col., 1980).

El **objetivo** planteado en este capítulo fue determinar la presencia de trehalosa por Cromatografía Gaseosa (CG), en quistes de *Acanthamoeba* spp.

Materiales y métodos:

Se trabajó con quistes identificados morfológicamente como pertenecientes al género *Acanthamoeba*, cultivados en medio MYAS durante dos meses, para asegurar la obtención de quistes maduros. Los quistes se concentraron por centrifugación hasta una concentración de 3,0 x 10^4 quistes/ml y se lavaron tres veces con agua destilada. Una porción fue sometida a sonicación por 15 minutos a 20°C para la destrucción de los quistes, mientras que la otra fracción contenía quistes intactos.
La extracción de la trehalosa se realizó por calentamiento a 80°C durante 20 minutos en baño de agua, las muestras se centrifugaron conservando el sobrenadante.
Paralelamente se preparan las soluciones testigos de 0,25g/l y 1,25gl de D(+)Trehalose dhydrate (Sigma T5251) en agua destilada.
Posteriormente 1 ml de las muestras y las soluciones testigos de trehalosa se colocan en tubos de vidrio con tapa a rosca, se congelaron a -20°C, para someterse al proceso de liofilizacion durante 36 h.
Al producto obtenido se le agrego 100µl de MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide) (Fig 5.2), para su derivatizacion, y transformarlo asi en un conpuesto volátil. Las muestras se conservaron entre 6-8°C hsta su uso.

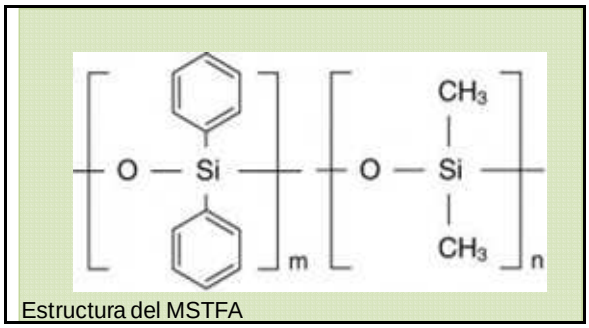


Figura 5.2: Estructura molecular del MSTFA

La cromatografía gaseosa (**GC**) se realizó utilizando un equipo marca Agilent technologies, modelo 6890N acoplado a un detector espectrómetro de masas modelo 5973N en modo *scan*. Se empleó una columna capilar modelo HP5 MS (0.25 mm x 30 m x 0.25um). El análisis de los datos se realizó empleando el software Chemstation/2001.

Inicialmente se analizaron por CG la solución testigo de trehalosa derivatizada, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, con el fin de determinar el tiempo de retención y observar el espectro correspondiente a la misma. Posteriormente se realizó la determinación cromatográfica del producto obtenido al trabajar con los quistes sonicados y sin sonicar

Resultados

En la Fig. 5.3 se puede observar el espectro cromatográfico correspondiente a la solución testigo de trehalosa, con un tiempo de retención de 4,28 segundos.

En un segundo análisis cromatográfico (Fig. 5.4), se realizó la determinación de trehalosa en quistes de *Acanthamoeba* enteros, sin sonicar.

La tercer corrida cromatográfica se realizó con el producto derivatizado de los quistes de *Acanthamoeba* que previos a la extracción habían sido sonicados por un lapso de 15 minutos. Como puede observarse en la Fig. 5.5, el pico correspondiente a los derivados de

la trehalosa se distingue por su tiempo de retención, coincidente con el de la solución testigo.

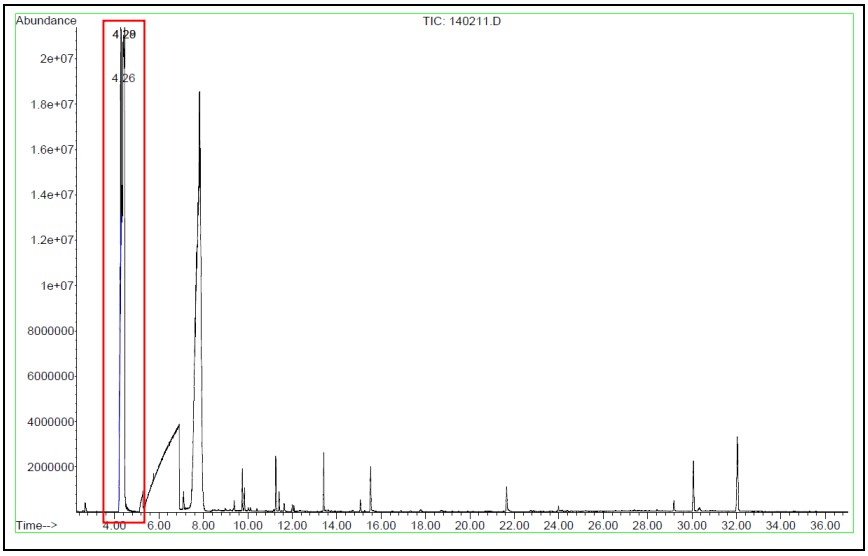


Figura 5.3: Cromatograma de la solución testigo de trehalosa. El recuadro señala el pico correspondiente a los productos derivados del disacárido, indicando su tiempo de retención.

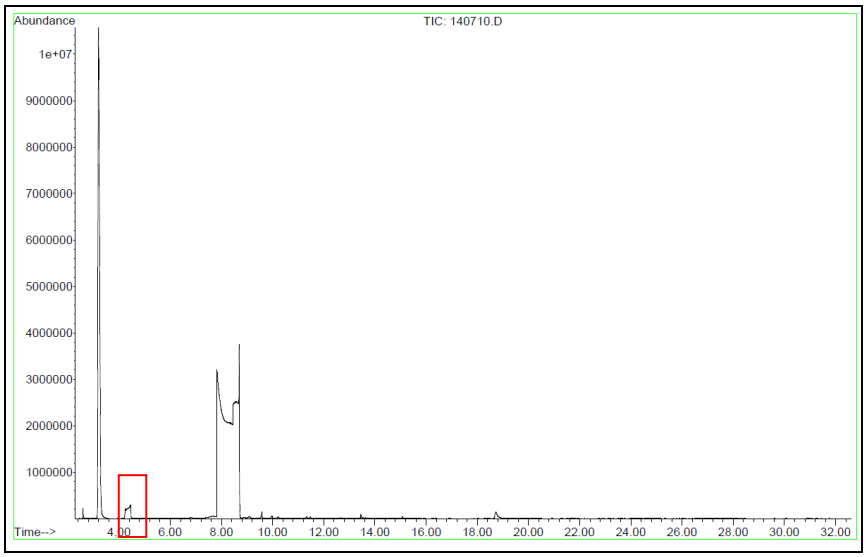


Figura 5.4: Cromatograma del producto de la extracción realizada sobre los quistes de *Acanthamoeba* enteros, sin sonicar. El recuadro señala el pico correspondiente a los derivados de la trehalosa.

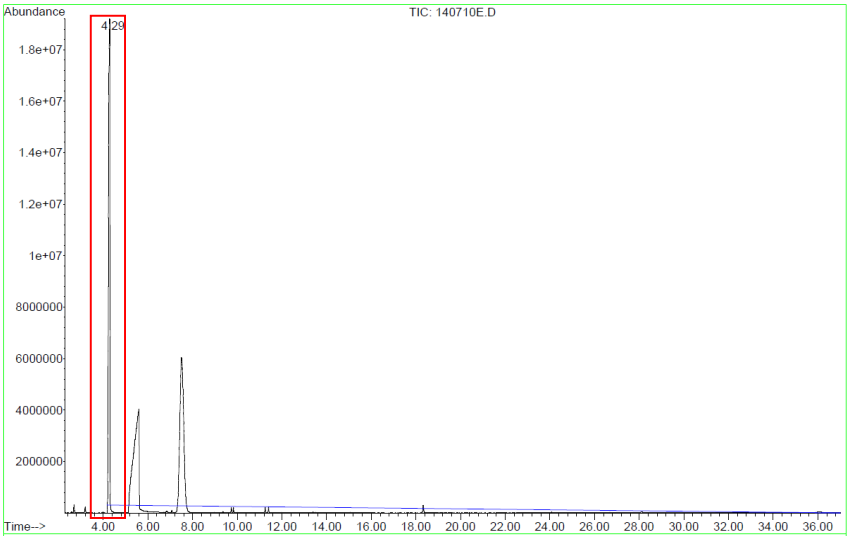


Figura 5.5: Cromatograma del producto de la extracción de trehalosa sobre quistes de *Acanthamoeba* sonicados. El recuadro indica el pico correspondiente a los productos derivados del disacárido.

Discusión y conclusiones

Mediante la observación y análisis de los cromatogramas obtenidos en la CG de los productos derivatizados de la trehalosa, podemos concluir que ésta sería una metodología adecuada para su detección en quistes de *Acanthamoeba* sp.

Observamos que con quistes sonicados la extracción del disacárido resultó significativamente más eficiente, hecho que se refleja en el incremento de la señal en la determinación por GC, respecto de la señal de los quistes enteros (sin sonicar).

La presencia de trehalosa en *Acanthamoeba* podría aportar, como en otros microorganismos, una ventaja biológica para resistir a situaciones de estrés, lo que permite generar hipótesis y un amplio campo para investigar, en otro estudio más profundo.

Capitulo 6

Tipificación molecular de los aislamientos de AVL

Introducción

La metodología de la Reacción en cadena de la Polimerasa, conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que fuera descripta por Mullis (1987), está basada en la simulación *in vitro* de lo que sucede intracelularmente de manera natural, replicando el ADN. Esta innovadora y creativa técnica, que si bien es sencilla de realizar requiere de aparatología especial, ha generado la necesidad de replantear la manera de tipificar, en nuestro caso, los géneros y especies de *Acanthamoeba* spp., aislados durante el presente estudio. La PCR permite obtener un gran número de copias a partir de un determinado segmento de ADN, ya que luego de 20 ciclos, se obtienen, aproximadamente, un millón de segmentos de ADN de doble cadena, (Schutzbank TE, 1994). En general, la técnica consiste en realizar una mezcla de reactivos (*Master mix*) a la cual se agrega un templado de ADN, que fuera previamente extraído de la célula que se desea estudiar (en nuestro caso tipificar). Esta ¨mezcla de reacción¨ luego se somete a varios ciclos de amplificación en un aparato denominado Termociclador (Russell D y col., 2001). Los ciclos de la amplificación someten a la mezcla de reacción a temperaturas de apertura de la doble cadena del ADN, desnaturalizándolo para luego unir los cebadores o *primers* (hibridación o *annealing*) y extensión de los fragmentos que fueron amplificados. Posteriormente, los productos obtenidos (amplicones) se deben detectar por diferentes técnicas: electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa, PCR-ELISA, PCR-*line blot* u oligocromatografía visual (Dieffenbach CW y col., 1993; Merino L y Giusiano, 2011).

Si bien la identificación genérica de *Acanthamoeba* por microscopía óptica, es relativamente sencilla (Page, 1967), la utilización de los caracteres morfológicos para la determinación de especie es dificultosa, no es específica y por lo tanto no es absolutamente determinante. En 1977 Pussard y Pons propusieron una clasificación grupal del género basada en las características morfológicas de los quistes, por lo que

entonces el género *Acanthamoeba* se dividió en tres grupos en base a la morfología y tamaño de los quistes de cada aislamiento.

Si bien esta clasificación fue científicamente aceptada, fue considerada poco confiable, ya que las características morfológicas de los quistes resultaron dependientes de las condiciones de cultivo (Sawyer y col., 1971). En la actualidad se han descripto más de 24 especies de *Acanthamoeba* identificadas únicamente por sus caracteres morfológicos (Visvesvara y col., 2007)

Con la intención de identificar las diferentes especies de *Acanthamoeba* se evaluaron criterios inmunológicos, bioquímicos y fisiológicos de estas amebas sin éxito alguno (Marciano-Cabral y col., 2003).

A fines de los 80 el descubrimiento de nuevas técnicas de biología molecular condujo a la realización de los primeros trabajos para la clasificación del género *Acanthamoeba* basados en el análisis de su secuencia genética. (Clark y col., 1988; Baverstock y col., 1989; Byers y col., 1990). En 1990 Johnson y col., analizaron la secuencia del gen 18 s rDNA de algunos aislamientos de *Acanthamoeba* y obtuvieron un agrupamiento que fue concordante con la clasificación de Pussard y Pons. Las diferencias entre las secuencias analizadas iban de 0 a 11,9% y se definieron inicialmente cuatro grupos de secuencias, de genotipos, denominados T1; T2; T3 y T4. Cada genotipo mostraba un 5% o más de diferencia en su secuencia (Khan, 2006). Posteriormente otros grupos de trabajo sumaron mayor cantidad de cepas que se sometieron a este tipo de análisis hasta llegar a identificar a 15 genotipos. (Stothard y col., 1998; Schroeder y col., 2001)

Basados en el análisis de la secuencia del gen 18S rDNA el género *Acanthamoeba,* actualmente, se encuentra dividido en 17 genotipos, denominados T1 a T17. En 2001 Schroeder y col., demostraron que el par de primers JDP1/JDP2 producía un amplicón específico para el género *Acanthamoeba*, y que a partir del análisis de su secuencia era

posible la identificación de los genotipos T1 a T17 (Stothard y col., 1998; Booton y col., 2005; Corsaro y col., 2010; Nuprasert y col., 2010). Este amplicón se denominó ASA.S1 por "*Acanthamoeba*-specific amplimer S1" y posee un tamaño de 423 a 551 pb dependiendo del genotipo. El par de primers, JDP1/JDP2 (Schroeder y col., 2001; Booton y col., 2002) fue utilizado en numerosos trabajos para la genotipificación de cepas de aislamientos ambientales y de muestras clínicas de diferentes lugares del mundo, siendo altamente específico para el género *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 2007; Niyyati y col., 2009; Cabello-Vílchez y col., 2014).

Por lo tanto y teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el objetivo de este capítulo, fue realizar un algoritmo diagnóstico para lograr la clasificación molecular de las cepas de *Acanthamoeba* aisladas en los distintos materiales clínicos y ambientales (recuperados para esta tesis), utilizando el par de primers JDP1/JDP2 descripto por Schroeder y col. en 2001.

Materiales y métodos

Cepas de *Acanthamoeba* spp.

Se procesaron para PCR un total de 71 muestras: 17 cepas para Sarmiento, Chubut, aisladas en otoño-invierno, incluida la cepa que ya se sabía que no correspondía a *Acanthamoeba* (No A no N); 40 muestras de piscinas, tanques, Arroyo Napostá y Sierra de la Ventana y las 14 restantes correspondieron a otras provincias y casos clínicos (Tabla 5.I).

Tabla 5.I: Sitios de muestreos y muetras procesadas para PCR.

Sitio de muestreo	Cultivos realizados	Cultivos positivos	ADN extraído
Piscinas	84	22	21 ω
Tanques	14	4	3 ω
A. Napostá	9	9	7 ω
Sierra de la Ventana	12	12	9 ω
Sarmiento (Chubut)	126	91	17 x
Otras Provincias	17	12	12
Casos Clínicos	4	2	2
Total	**266**	**152**	**71**

x Se realizó extracción del material genético únicamente de las cepas aisladas en las estaciones de otoño e invierno.
ω La diferencia entre el número de cultivos positivos y las extracciones realizadas se debe a que hubo cepas que no fueron posibles de recuperar a partir de los cultivos originales.

Se trabajó con repiques de los aislamientos, en medio líquido MYAS, incubado entre 24 y 48 horas a 37 ° C. Durante la incubación se realizaron observaciones al microscopio óptico, en fresco, para trabajar con una concentración de trofozoítos mayor del 80% en relación a los quistes y estadios intermedios, ya que con los quistes la extracción del material genético era muy difícil, probablemente debido a la gruesa pared quística que se demostró, poseen (ver capítulo de ultraestructura). Para concentrar los trofozoítos se centrifugó el cultivo, 5 veces, en tubos estériles de 15 ml con tapa a rosca. El pellet obtenido es el que se utilizó para la extracción de ADN.
La metodología empleada fue puesta a punto con una cepa de A. polyphaga ATCC, utilizada en todas las determinaciones como control positivo.

Extracción de material genético.

El material genético, como ya se expuso, fue extraído a partir de trofozoítos de AVL.

La extracción se realizó con Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico.

Para cada aislamiento, se aplicó el siguiente procedimiento:

1. El pellet de trofozoítos se lavó dos veces con PBS estéril. El tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés, **PBS**, de *phosphate buffered saline*) es una solución tampón o buffer que se utiliza en investigación biológica, bioquímica y de inmunología. Es una solución acuosa y salina. Su osmolaridad y concentración de iones es semejante a la del líquido extracelular de mamíferos. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano (isotónico). Es una solución isotónica, no tóxica para las células de los mamíferos, y pH de 7.4.
2. La suspensión celular obtenida se pasó 5 veces por aguja 21G para lisar las amebas.
3. Al lisado se la agregó Buffer de Proteinasa K (SDS 0,5%; EDTA 5 mM; Tris-HCl 10 mM) y Proteinasa K (20mg/ml). Se incubó durante dos horas a 65°C en baño de agua.
4. Para la extracción de ADN se agregó una mezcla de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1).
5. Se centrifugó 10 min a 13.000g, recuperando la fase acuosa superior.
6. A esta fase se le agregó Éter Etílico saturado en agua, y posteriormente se centrifugó 2 min a 13.000 g para separar las fases, descartando la fase orgánica superior. Este paso se repitió dos veces.
7. Se dejó evaporar el éter, y el pellet se suspendió en ½ volumen de Acetato de Amonio 7,5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.
8. Los tubos se dejaron a -20°C toda la noche.
9. Luego se centrifugaron 20 min a 15.000g, se descartó el sobrenadante, y el sedimento fue suspendido en etanol 80%.
10. Se repitió la centrifugación y se descartó todo el sobrenadante.
11. Los pellet secos se suspendieron en 200 µl de agua desionizada estéril. El material extraído se conservó a -20°C hasta la realización de la PCR.

Amplificación por PCR (Polymerase-Chain Reaction):

La amplificación por PCR se basó el protocolo publicado por Booton y col., 2002; con algunas modificaciones.

Primers o Cebadores: se utilizó el par JDP1 / JDP2 específicos para el género *Acanthamoeba*.

JDP1 (5´-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3´)

JDP2 (5´-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3´)

La mezcla de reacción, para un volumen final de 25µl, se preparó de la siguiente manera:

-10X Pfu buffer con $MgSO_4$: 2,5 µl

-dNTP mix (10 mM de cada dNTP, Fermentas, Lot: 00069752): 1,0 µl

-Primer forward (1 µM): 1,5 µl

-Primer reverse (1 µM): 1,5 µl

-Templado de ADN: 5,0 µl

-Pfu DNA polymerase (Fermentas, 2,5 u/ µl, Lot: 00081337): 0,25 µl.

Para el desarrollo de la PCR se utilizó un termociclador Biometra UNO-Thermoblock-TM. Software versión 2.73. Las condiciones de reacción fueron: 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 54°C por 30seg, 72°C por 2min, y una extensión a 72°C por 15 min.

Para la detección de los productos de la reacción, utilizamos electroforesis en geles de agarosa, los cuales fueron coloreados para posteriormente proceder a la interpretación de los patrones de bandas obtenidos, ya que es el que más se utiliza y era el que estaba a nuestro alcance en el lugar de trabajo (UNS).

Los productos de amplificación separados en gel de agarosa (*Biodynamics*) al 2%, se tiñeron con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio (Mo Bio Laboratories, Inc. Cat # 15006-1) y se visualizaron bajo luz UV con un Ultra Bright transiluminador UV Maestro-GEN, Catalog Number MLB-21, versión 01_10.

Como marcador de peso molecular se utilizó 100 pb, DNA Ladder (Mo Bio Laboratories, Inc. Catalog# 17100-40).

Siembra en el gel: se sembraron 5 calles L: ladder, CP1: control positivo 1, CP2: control positivo 2, CN: control negativo, AP: *Acanthamoeba polyphaga* ATCC (Control positivo) (Fig. 6.1).

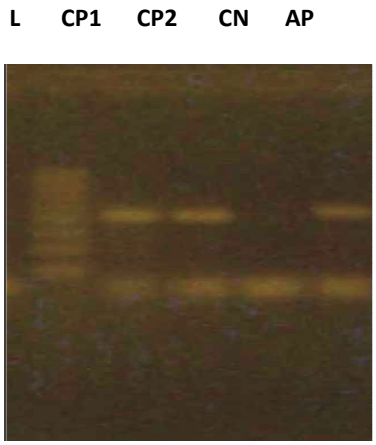


Figura 6.1: Gel de agarosa en donde se muestran L: ladder, CP1: control positivo1, CP2: control positivo 2, CN: control negativo y AP: *Acanthamoeba polyphaga* ATCC como control positivo.

Elaboración de Algoritmo diagnóstico.

Se realizó un *screening* de las cepas aisladas con el par de cebadores (*primers*) JDP1 / JDP2, con material genético extraído mediante el protocolo detallado bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Se consideró **PCR positiva** cuando se visualizó en el gel de agarosa una banda de material genético ubicada entre los 423 a 551 pb correspondiente al segmento ASA.S1, y **PCR negativa** cuando no se observó banda del tamaño mencionado.

A las cepas con PCR negativa después de este primer tamizaje se les repitió la extracción de material genético, utilizando el Kit comercial Quick-gDNA^{TM} MiniPrep de ZYMO RESEARCH y la PCR bajo las mismas condiciones de reacción señaladas anteriormente.

A las cepas que continuaron siendo negativas, se les aplicó la PCR en las mismas condiciones pero con una dilución 1/10 (Dil 1/10) de sus extractos como templado.

A las cepas con PCR negativa hasta este punto se les repitió la técnica con el templado sin diluir pero utilizando la enzima Go Taq polymerase.

La metodología empleada y los diferentes procedimientos utilizados, se resumieron para la elaboración de una propuesta de algoritmo diagnóstico, útil para realizar las identificaciones moleculares de las cepas de AVL aisladas (Fig. 6.2).

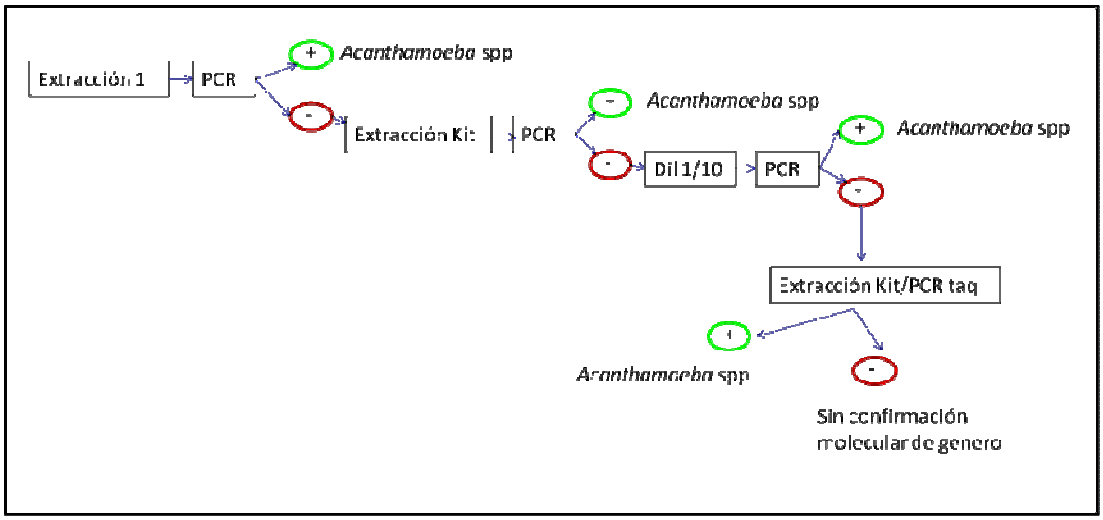


Figura 6.2: Algoritmo diagnóstico empleado en esta tesis para la tipificación molecular de AVL.

Resultados

De los 152 aislamientos positivos para AVL realizados mediante métodos morfológicos, sólo se procesaron para tipificar genéticamente 71 cepas (46,7%), aplicando el algoritmo descripto precedentemente. La diferencia entre el número de cultivos positivos y las tipificaciones realizadas se debió a que hubo 81 cepas (53,3%) que no se pudieron recuperar a partir de los cultivos originales.

De las 71 extracciones, la PCR resultó positiva para 59 aislamientos, confirmándose así la clasificación morfológica asignada de pertenencia al género *Acanthamoeba* en el 83,1% de las muestras de aisladas. Cinco cepas quedaron sin confirmación molecular de género (7,04%) y en 7 (9,86%) no hubo recuperación del ADN extraído. Para estas 12 cepas donde no se extrajo DNA (¨negativas¨) (16,9%) se realizaron duplicados con idénticos resultados. La cepa denominada *No A no N* es estudiada en el Capitulo 7 de esta tesis.

En la Tabla 5.II se detallan los resultados obtenidos a partir de los de los distintos aislamientos.

TABLA 5.II: Distribución de los aislamientos y resultados de PCR para cada uno de los mismos.

Sitio de muestreo	Cultivos realizados	Cultivos positivos	ADN extraído	PCR		Sin recuperación de ADN
				(+)	(-)	
Piscinas	84	22	21 ω	19	--	2
Tanques	14	4	3 ω	2	--	1
A. Napostá	9	9	7 ω	7	--	
Sierra de la Ventana	12	12	9 ω	6	2	1
Sarmiento (Chubut)	126	91	17 x	15	1 x	1
Otras Provincias	17	12	12	8	2	2
Casos Clínicos	4	2	2	2	--	--
Total	**266**	**152**	**71**	**59**	**5 σ**	**7**

x Se realizó extracción del material genético únicamente de las cepas aisladas en las estaciones de otoño e invierno.

ω La diferencia entre el número de cultivos positivos y las extracciones realizadas se debe a que hubo cepas que no fueron posibles de recuperar a partir de los cultivos originales.

x Aquí está incluida la cepa "No A No N", que si bien no se corresponde morfológicamente a *Acanthamoeba*, era pertinente realizar PCR para comprobar lo observado microscópicamente.

σ sin confirmación molecular de género.

En las Fig. 6.1 y 6.3 se muestran distintas corridas electroforéticas de las muestras aisladas, aplicando el algoritmo diagnostico diseñado.

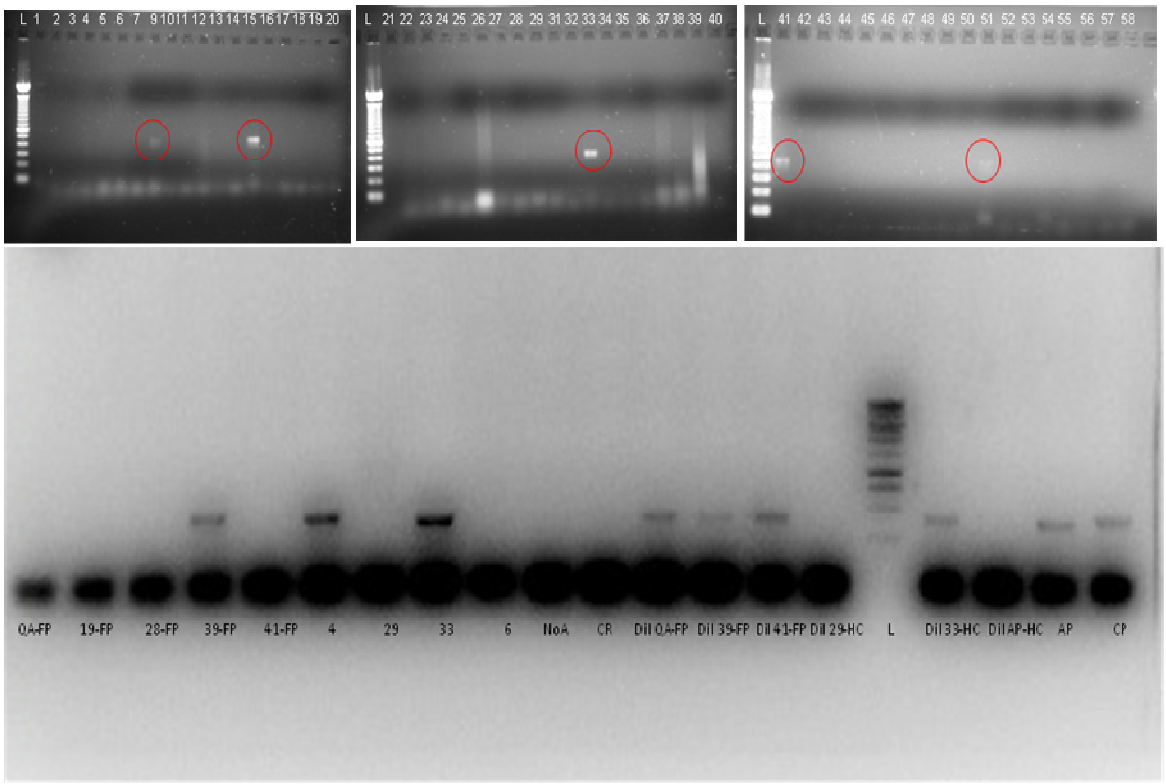


Figura 6.3: Corrida electroforética de los productos de la PCR. L: *Ladder*, marcador de peso molecular; QA: Cepa asilada de una caso de QA; AP: *Acanthamoeba polyphaga*; NoA: No A no N; CR: control de reactivos; CP: Control positivo. Dil indica que el material genético fue diluido previamente a ser utilizado como templado para la PCR.

Para 5 cepas (Ver Tabla 5.III) se les realizó secuenciación y posterior análisis por Blat, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.III.

TABLA 5.III: Resultados de purificación-secuenciación y análisis por Blat correspondientes a 5 cepas.

Cepa	% de Identidad	GENOTIPO	Especie relacionada
4	99% (9e-76)	-	*A. castellani*
	98% (7e-112)	T4	
33	98% (8e-76)	T5	
	99% (1e-89)		*A. lenticulata*
QA	100% (1e-69)	T4	*Acanthamoeba* sp.
39	97 % (3e-105)	T15	*A. jacobsi*
41	99% (5e-73)	T4	

La cepa asilada del caso de QA correspondió a genotipo T4, lo cual concuerda con la literatura consultada, ya que le adjudican a T4 la mayoría de los casos de queratitis. (Schroeder y col., 2001; Zhang y col., 2004; Maghsood y col., 2005; De Jonckheere, 2007; Niyyati y col., 2009; Cabello-Vílchez y col., 2014)

Los genotipos T5 y T15 fueron aislados a partir de muestras de aguas naturales, lo que también concuerda con la bibliografía, que señala que estos genotipos han sido aislados de distintas muestras ambientales en diferentes partes del mundo (Brasil, Turquía, entre otros) (Tsvetkova y col., 2004; De Jonckheere, 2007)

Discusión y conclusiones:

La puesta a punto de la metodología de extracción presentó varios inconvenientes. En las primeras experiencias no fue posible lograr la extracción del material genético con la técnica de fenol-cloroformo convencional. Por esta razón, después de probar varios protocolos se estableció el que se detalló precedentemente, que posee como variante un paso adicional de ruptura de las células haciéndolas pasar por una aguja 25G cinco veces, y además se duplicó la concentración de Proteinasa *K* que se aplica antes de la extracción con solventes.

-Antes de realizar la extracción, los cultivos fueron controlados por observación en fresco al microscopio óptico, para asegurar una buena concentración de trofozoítos, debido a que la extracción de material genético a partir de los quistes no resultó efectiva, probablemente debido a la gruesa cubierta quística que pudimos documentar por TEM (cap 4 de la presente Tesis).

-A pesar de que otros autores (Niyyati y col., 2009) afirman que el protocolo aplicado para estos protozoos es altamente sensible y que con sólo un trofozoíto es posible aislar DNA,

en nuestra experiencia, fue necesario concentrar los cultivos para lograr recuperar una buena cantidad de material genético.

Con estos ensayos se confirmó la ubicación taxonómica de 59 aislamientos dentro de género *Acanthamoeba*. De esta manera, fue posible comprobar la clasificación realizada previamente por características morfológicas, en el 83,1% de las cepas aisladas en los diferentes sectores de Argentina estudiados en esta Tesis, posicionándolos como *Acanthamoeba* spp.

-Para la genotipificación del 16,9% de muestras negativas, será necesaria la purificación y secuenciación de los productos de la PRC utilizando las técnicas moleculares pertinentes, lo que será considerado en una futura línea de trabajo que incluya los temas derivados de la presente tesis.

-Los aislamientos y el material genético se conservan a temperatura ambiente y a -20°C, respectivamente, en la Cátedra de Parasitología Clínica del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, para futuras investigaciones propias o en colaboración con otros Grupos de Investigación que lo deseen.

Capitulo 7

Cepa "*No A no N*" y partículas virales endosimbiontes

7. 1. Cepa *No A no N*

Introducción

Como parte de un muestreo de aguas de Argentina para la búsqueda de Amebas de Vida Libre (AVL), en diciembre de 2009 se concurrió a la pileta Municipal de la localidad de Sarmiento, Provincia del Chubut, de uso recreacional, cubierta y que se llena con agua corriente, cuya temperatura oscila entre 26 y 30°C.

Se colectaron muestras de agua de la superficie, del fondo y de raspado de pared de la piscina.

Las muestras de superficie, y raspado de pared resultaron negativas para la búsqueda de AVL, mientras que en la muestra de fondo se obtuvo cultivo positivo.

La AVL aislada fue morfológicamente diferente de las aisladas hasta el momento. La ausencia de acantópodos indicaba que no pertenecía al género *Acanthamoeba* y como la prueba de transformación ameboflagelar fue negativa, se descartó su pertenencia al género *Naegleria*; por lo que, al no tener certeza de género, decidimos denominarla **Cepa "*No A no N*"**, indicando que no se trataría ni de *Acanthamoeba* spp., ni de *Naegleria* spp. (Ver Capitulo 2).

Desde el punto de vista morfológico, esta AVL no pertenece a ningún género conocido, por lo que, su caracterización molecular queda planteada para una tesis posdoctoral u otro proyecto de investigación futuro. Lo que sí podemos asegurar es el valor del hallazgo, no solo de la cepa en cuestión, sino de su virus endosimbiontes, que no integra el espectro

de virus conocidos, lo que puede ser muy relevante en Salud Pública, no solo humana sino también animal. Es por ello que su caracterización total también requeriría un estudio más profundo que excede a los objetivos de esta tesis.

Materiales y Métodos

Aislamiento de la cepa

La siembra para el aislamiento inicial de esta cepa, fue realizada, al igual que para el resto de las AVL recuperadas de las diferentes muestras de agua, por siembra en medio Agar No Nutritivo (ANN).

La cepa "No A No N" fue repicada en medio líquido MYAS, con una suspensión de bacterias, e incubada a 37°C, con la finalidad de disponer de material suficiente para realizar los estudios tendientes a su identificación a nivel de género.

Microscopía óptica

Se trabajó con preparados en fresco, obtenidos a partir de cultivos en ANN, de la cepa en cuestión. Se observaron con objetivos secos y de inmersión en microscopio óptico. Se midieron trofozoítos y quistes con ocular micrométrico, y se registraron imágenes fotográficas de los mismos.

Imágenes adquiridas por Microscopía de Contraste Diferencial Interferencial (DIC Nomarski)

El DIC es una técnica de contraste de fases que produce imágenes con un efecto óptico característico de relieve "3-D". En estas imágenes se pueden visualizar estructuras transparentes debido a los cambios del índice de refracción. A diferencia de la técnica de contraste de fases convencional, la cual se basa en cambios de la longitud del camino óptico, el DIC está basado en el gradiente de la longitud del camino óptico (promedio de

cambio en la longitud de onda del filo óptico). Los gradientes repentinos producen el alto contraste y el efecto de relieve 3-D que es característico del DIC.
El contraste en las imágenes DIC es producido exclusivamente a través de un efecto óptico. Esta técnica por lo tanto, es ideal para especímenes vivos sin teñir (por ejemplo, cultivos celulares, embriones, frotis sanguíneos, diatomeas, protozoarios). El DIC brinda información morfológica sin la necesidad de usar tintes potencialmente tóxicos y fluoróforos. Sin embargo, el DIC se usa con frecuencia en asociación con fluorescencia para revelar características morfológicas del espécimen.

Se registraron imágenes de trofozoítos y quistes del aislamiento a partir de preparados en fresco de la cepa en medio MYAS, utilizando un microscopio Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM). Descripción ultraestructural de trofozoítos y / o quistes

La microscopía electrónica se realizó sobre un concentrado de la cepa en medio MYAS, de la misma manera que se realizó para documentar la ultraestructura de *Acanthamoeba* spp. y que fue descripta en el capítulo 4, por lo cual no la reiteramos aquí.
Las observaciones fueron realizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo 100 CXII a 80 KV. Las micrografías fueron tomadas con SO-163 Kodak electron Image-film.

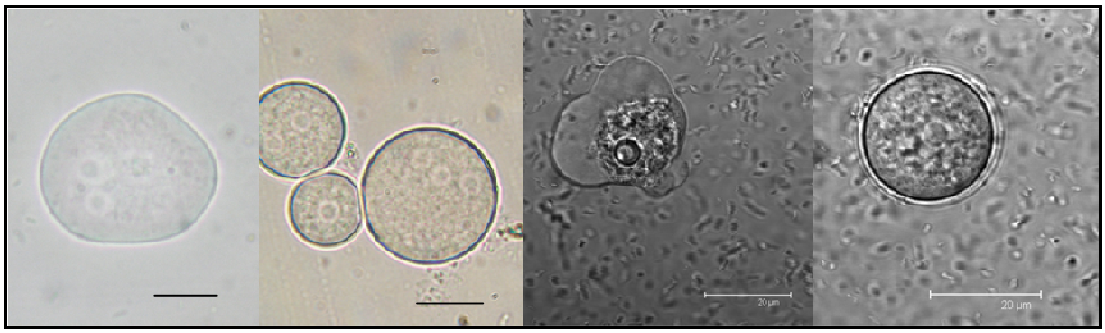
Resultados

Esta cepa "*No A No N"* de AVL, creció normalmente en el medio ANN, manteniendo todas sus características morfológicas, tanto en quistes como en trofozoítos, e inclusive, un hallazgo muy importante, fue la observación (Ver TEM) de partículas compatibles con virus, que se preservaron en los sub-cultivos.

Al **microscopio óptico** (MO) se observaron trofozoítos, con un diámetro medio de 32,0 ± 3,5 µm, con movimiento eruptivo por emisión de seudópodos anchos formados por citoplasma hialino, sin la formación de acantópodos. Presentaron núcleos vesiculares, observándose en número variable de 1 a 2 por célula. El citoplasma presentó numerosas vacuolas y se observó rodeado externamente por una capa refringente (Fig. 7.1. a).

Los quistes se observaron esféricos, rodeados por una gruesa pared refringente, de tamaño variable, entre 12,5 y 22,5 µm de diámetro. En ellos el número de núcleos fue de 1 a 4, estos se observaron con la cromatina compacta, central y esférica (Fig. 7.1. b).

Las imágenes obtenidas por microscopia confocal, imágenes DIC, confirman las características descriptas por microscopia óptica (Fig. 7.1. c y d).

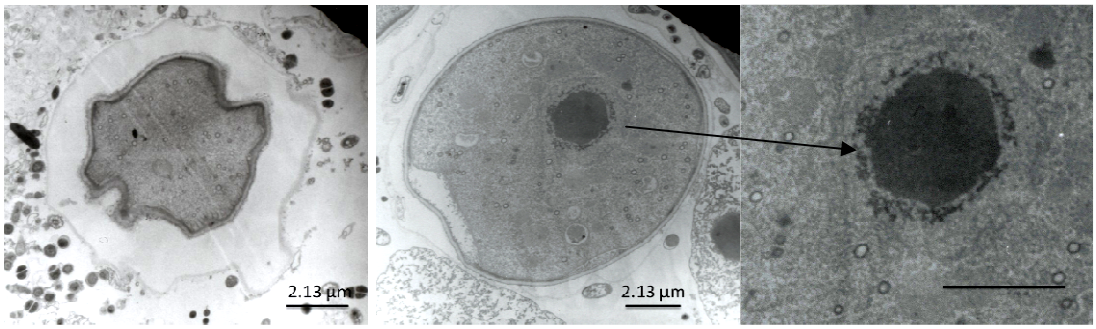


a **b** **c** **d**

Figura 7.1. **Imagen a**, muestra un trofozoíto, donde se visualizan los dos núcleos y la ausencia de acantópodos. **Imagen b**, muestra tres quistes, uno de ellos con tres núcleos. (Barras: 10 micras). **Imágenes c y d**, muestran trofozoíto y quiste respectivamente en microscopio confocal.

TEM: solo se lograron imágenes de quistes, con diámetro de 10,0 a 13,3 µm, rodeados por una pared doble, la más externa gruesa, y la interna delgada y electrodensa. En nuestras micrografías observamos un solo núcleo por célula con un diámetro de 3,6 µm, con cromatina compacta central, de 2,3 µm de diámetro, con abundantes gránulos entre esta y la membrana nuclear (Fig. 7.2). En su citoplasma se observaron numerosas vacuolas conteniendo material amorfo y abundantes mitocondrias de 0,8 a 1,3 µm de diámetro. Al realizar micrografías a mayor aumento se pudieron observar numerosas inclusiones

citoplasmáticas, de alrededor de 0.22 µm de diámetro, compatibles morfológicamente con partículas virales (Fig. 7.2 y 7.3).



a **b** **c**

Figura 7.2: Micrografias al TEM de quiste entero para ver la pared (**a**), otro quiste donde se puede ver el núcleo y otros componentes citoplasmáticos (**b**), y por último una ampliacion del núcleo (**c**) rodeado de una cisterna nuclear (Flecha). En las tres imágenes se visualizan, en el contenido quístico, pequeñas inclusiones citoplasmáticas, esféricas, compatibles morfológicamente con partículas virales.

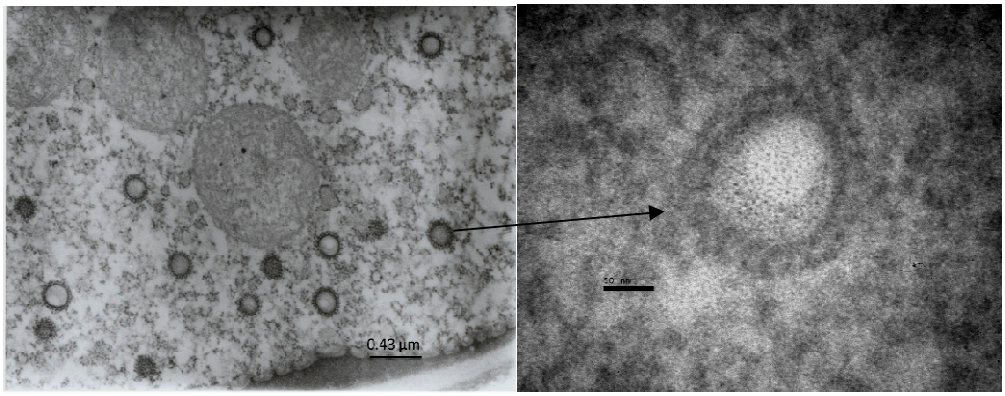


Figura 7.3: citoplasma de la Fig. 2, donde se observan, a mayor magnificación, las inclusiones citoplasmáticas, esféricas, compatibles morfológicamente con partículas virales (Flecha).

Discusión y conclusiones:

Como los estudios morfológicos realizados no permitieron identificar el género de esta AVL, la caracterización de la cepa "No A No N" será motivo de estudio en el futuro, como ya se indicó precedentemente.

7. 2. Caracterización preliminar de las estructuras citoplasmáticas compatibles con morfología viral

Fraccionamiento sub-celular para obtener partículas virales endosimbiontes

Una característica estructural de los virus es que constituyen verdaderas partículas microscópicas y, en consecuencia, puede usarse dicha característica para aislar las mismas por centrifugación diferencial. Una vez aisladas, dichas partículas deberían mantener una forma y tamaño compatibles con lo observado por TEM realizadas a partir de los cortes microtómicos de los trofozoitos. Con esta lógica se procedió al fraccionamiento sub-celular de los trofozoítos provenientes de cultivo.

Con el objetivo de aislar las partículas virales endosimbiontes descriptas (Fig. 7.2 y 7.3), un concentrado de los trofozoítos de la cepa "*No A No N"*, fue sometido al protocolo de centrifugación diferencial, separando así distintos componentes sub-celulares hasta obtener en el último concentrado las partículas virales purificadas, a partir del cual se realizaron micrografías al TEM. Para ello, se realizó el fraccionamiento sub-celular de los trofozoítos (Chlapowski, 1971), para analizar por TEM, y aplicar técnicas de biología molecular a las distintas fracciones, siguiendo los siguientes pasos:

Se trabajó con cultivos de trofozoítos en medio líquido MYAS, los que fueron concentrados por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min.

El pellet obtenido se lavó con dos volúmenes de solución SMT (Sucrosa 0,25M, $MgSO_4$ 0,002M y Tris 0,005M) fría. Luego de los lavados se llevó a un volumen de aproximadamente 15 ml con la misma solución y se homogenizó manualmente. Posteriormente se centrifugó en ultracentrífuga durante 15 min a 2000 g. En el pellet se quedaron los núcleos, y el sobrenadante volvió a centrifugarse, pero esta vez a 12.500 g durante 25 min. Se conservó el sobrenadante para centrifugarlo nuevamente a 100.000 g durante 70 min. En el pellet obtenido de esta centrifugación se concentraron las partículas virales, y se descartó el sobrenadante. Con el pellet final obtenido, luego del fraccionamiento subcelular, para realizar observaciones al TEM, se procedió según la técnica publicada por Costamagna et al, 1996, y detallada en el Cap. 4.

En estas imágenes se confirmó la similitud morfológica de las partículas aisladas con partículas virales, aunque en las microfotografías (Fig. 7.4) la morfología viral se presenta alterada (respecto de lo observado en las Fig. 7.2 y 7.3) en relación con las partículas citoplasmáticas, probablemente debido al proceso de fraccionamiento subcelular. De todas maneras es destacable la congruencia en el tamaño y la característica particulada de las estructuras observadas, aportando indicios de la naturaleza viral de las mismas.

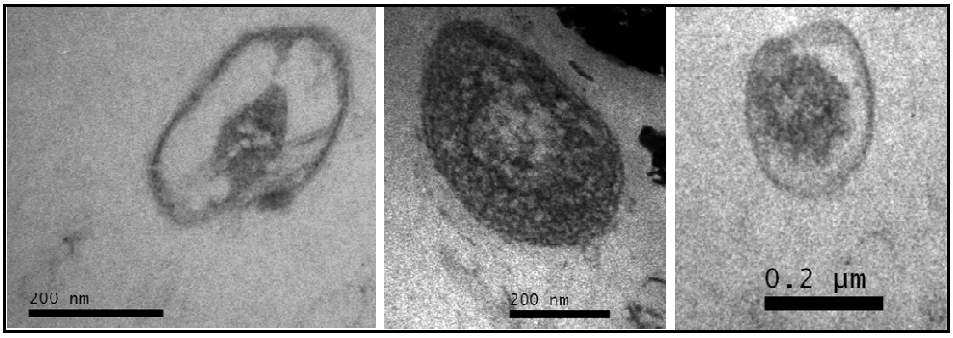


Figura 7.4: Partículas virales (obtenidas al TEM) del último pellet de la centrifugación direfencial.

La información obtenida sobre la cepa “No A No N” a partir de los estudios morfológicos realizados, tanto por MO como por TEM, no fue suficiente para clasificar esta AVL. Sus características estructurales no resultaron coincidentes con las AVL descriptas en la

literatura consultada (Michael y col., 2006; Corsaroa y col., 2010; Michel y col., 2006; Bromn y col.,2007; Walochnik y col., 2009; Smirnov y col., 2000, Dylová y col., 2005).

Los trabajos tendientes a la tipificación de las partículas virales endosimbiontes se iniciaron en nuestro laboratorio de la Cátedra de Parasitología Clínica de la Universidad Nacional del Sur (UNS), con la colaboración del Dr. José Luis Lopez de la Cátedra de Virología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA).

Inicialmente sumamos esta cepa al screening molecular (PCR) que se realizó para confirmar la pertenencia o no al género *Acanthamoeba*, detallado en el Capitulo 6, con el par de primer JDP1 / JDP2. En la corrida electroforética de los productos de la PCR realizada no se evidenció ningún tipo de banda para esta cepa. La ausencia de producto de PCR en las condiciones utilizadas en nuestro trabajo sugiere que la especificidad nucleotídica del gen RNAr 18S de nuestra AVL podría ser diferente de aquella de los cebadores utilizados. Esto sumaría evidencias respecto de la desconocida filiación del microorganismo en estudio.

Dados los resultados obtenidos, luego se realizó la PCR pero con el par de primers SSU1 / SSU2, que permite la amplificación de una porción del 18s RNA de eucariotas, y que a través de su posterior secuenciación permite la identificacion de la especie. Se trabajó con un concentrado de quistes y trofozoítos de la cepa en medio líquido MYAS.

El protocolo de extración que se aplicó, fue el siguiente:
Los trofozoítos y quistes concentrados se resuspendieron en Buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) en un volumen no mayor a 400 µl. Se añadió igual volumen de Fenol equilibrado pH8 y se centrifugó a máxima velocidad durante diez minutos. Se recuperó la fase acuosa superior y se añadió igual volumen de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 - v/v). Nuevamente se centrifugó a máxima velocidad para recuperar la

fase acuosa superior. A ésta se le agregó igual volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Se recuperó la fase acuosa y se agregó 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3 M pH 5,2; se mezcló suavemente y se añadieron 2,5 volúmenes de etanol 96° pre-enfriado a -20°C. Se dejó reposar toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min, se removió el etanol con cuidado, y se agregaron 500 µl de etanol 70% pre-enfriado a -20°C. Se centrifugó nuevamente y se removió completamente el etanol. Por último el pellet obtenido se resuspendió en agua bidestilada estéril, y se conservó a -20°C hasta su utilización.

Para la PCR se utilizó la enzima Go Tag polymerase (*Invitrogen*). (Coctel de amplificación (vf 25 ml): 5X Green buffer (7,5mM $MgCl_2$), dNTP mix (10mM c/u), Primers (10pmol/µl), Go Taq polymerase (1,25 U), agua destilada csp 20µl, templado 5µl).
Las condiciones de reacción fueron: 95°C durante 2 min, 30 ciclos: 94°C por 30 seg, 53 °C por 30 seg y 72 °C 3 min 30 seg. Por último, un paso final a 72°C durante 15 min.

Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0,8%, y se revelaron con SYBR Safe DNA gel stain (*Invitrogen*).

Previo a la realización los ensayos, se realizó una corrida de una dilución del extracto para confirmar la presencia de material genético. Se observó material solo en el extracto de los trofozoítos, no se detectó material genético de los quistes, por lo que podemos decir que éstos no representan un buen material de partida para la PCR, al menos en las condiciones de extracción utilizadas aquí.
Luego de la PCR, en la corrida de los productos, solo se observaron bandas en las calles que corresponden a los trofozoítos, en las que se observaron varias bandas, una de las cuales poseía un tamaño aproximado de 2500 pb, lo que coincide con lo esperado para amebas. Esta banda debería haberse purificado y secuenciado para su identificación, paso que no pudo realizarse por falta de recursos económicos.

Con el objeto de aumentar la especificad de la PCR se diseñó un par de primer denominado **JL1** (5´- TTA AGC CAT GCA TGT CTA AG-3´); **JL2** (5´-CTG TGA TCG CCT TCA GAT G-3´) específico para el 18S de un amplio grupo de amebas, e incluso para otros parásitos (como *Trichinella* sp.).

El material genético se extrajo como se detalla en el Capítulo 6. Para este protocolo se utilizó la enzima Pfu DNA polymerase (Coctel de reacción (vf 25 ml): Pfu buffer (20 mM $MgCl_2$), dNTP mix 10mM c/u, primers 1µM, Pfu DNA Pol 1,25u/50µl, agua destilada csp 20µl y templado 5µl); las condiciones de reacción fueron: 3 min 95°C, 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 50°C y 2 min a 72°C y por ultimo 15 min 72°C. La cepa *A. polyphaga* ATCC, se utilizó como control positivo. La corrida electroforética de los productos de la PCR no reveló ninguna banda ni en la cepa control, ni en la de estudio. Por esta razón se precedió a modificar la temperatura de annealing del programa de ciclado, disminuyéndola a 45°C. Con este nuevo protocolo se pudo observar una banda de material amplificado, aproximadamente 500 pb, en la cepa que corresponde al control positivo, pero no en la cepa *No A no N*.

Una vez puesto a punto el programa de ciclado se aplicó al material extraído del concentrado de los núcleos de la ameba que se obtuvieron luego del fraccionamiento subcelular y al material extraído de la célula entera.

Previo a la PCR se realizaron diluciones del templado desde 1/10 hasta 1/10.000. En este caso se obtuvo una sola banda para el material extraído del concentrado de núcleos, y cuatro bandas sobre el material extraído de la célula entera, en ambos casos las bandas se observaron en las diluciones 1/10 y 1/100 de cada templado (Fig.7.5).

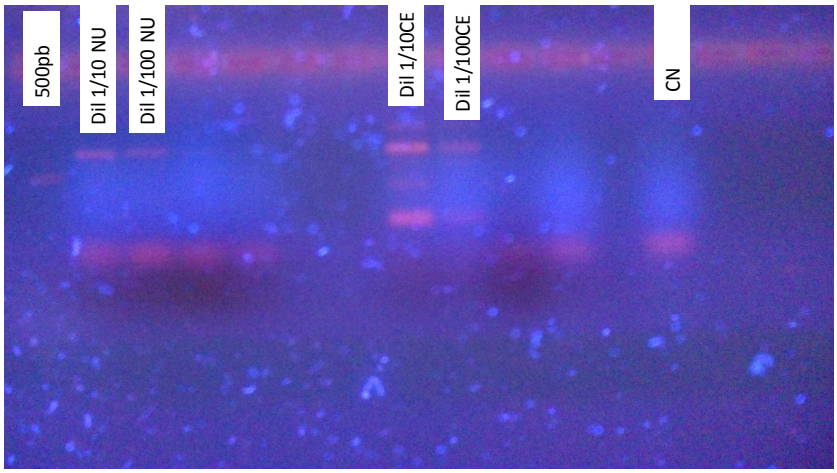


Figura 7.5: PCR de diluciones del templado. Dil NU: Dilucion del extracto de ADN concentrado del Nucleo. Dil CE: Dilucion del extracto de Celulas Enteras.

El paso siguiente sería la purificación y secuenciación de estos segmentos, cuya realización queda planteada para futuros estudios pues escapan a los objetivos de esta tesis. La cepa "*No A No N"* y las partículas virales (endosimbiontes), fueron hallazgos sobre los cuales trabajamos en una etapa inicial, pero cuyo estudio requiere mayor equipamiento y un trabajo más profundo.

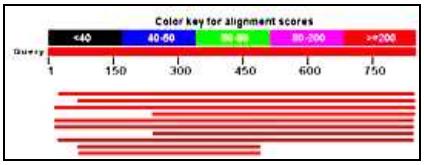
Con referencia a la **identificación del virus**: Los virus asociados a las amebas se han ubicado en la clase de grandes virus DNA núcleo-citoplasmático. Por su biología, las amebas pueden intercambiar genes con los organismos ingeridos y facilitar la transferencia lateral de genes (Raoult y col., 2010).

En este punto se trabajó con el extracto semipurificado de partículas virales que se obtuvo luego de la centrifugación diferencial de un concentrado de trofozoítos en medio líquido.

A partir de estos virus semipurificados se extrajo ácido nucleico usando el método de proteinasa K y cloroformo, detallado en el capítulo 6. Los genomas purificados fueron amplificados al azar (RAPD con seis primers de la serie Operon). Los productos de la

amplificación fueron clonados molecularmente y secuenciados. Finalmente las secuencias nucleotidicas fueron analizadas por BLAST [Nucleotide Blast; Highly similar sequenses (megablast) y Protein Blast (protein-protein BLAST o PSI-BLAST: position-specific Iterated BLAST)] para encontrar genes homólogos depositados en las bases de datos.

Como mencionamos, las microfotografías al TEM mostraron partículas virales intracelulares, esféricas, aparentemente envueltas, con un tamaño entre 200 y 300 nm. Dicha morfología fue similar a la observada en las microfotografías realizadas luego del fraccionamiento subcelular. Entre las secuencias nucleotídicas amplificadas al azar, particularmente aquella del clon molecular VARAPD-4 (aprox. 1000pb), mostró, en su extremo 5´, un 49% de cobertura y 80 % de identidad con **Stealth Virus 1** (clon 3B43); llamativamente, entre el 91-96 % del mismo clon mostró una identidad del 85% con RNA 23S de diferentes bacterias. Stealth Virus 1 (un Citomegalovirus de mono verde africano modificado) ha sido descripto parcialmente y contiene genoma bacteriano incorporado. Por otro lado, el clon VARAPD-2 (ORF2-5´3´) mostró un 62% de cobertura y 55% de identidad con la glicoproteína B de Pan troglodytes cytomegalovirus 2.2.



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AE006468.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2, co	867	4321	96%	0.0	96%	
CP001277.1	Haemophilus influenzae R2866, complete genome	822	4909	91%	0.0	89%	
CP001277.1	Candidatus Hamiltonella defensa 5AT (Acyrthosiphon pisum), comple	797	2391	88%	0.0	94%	
CP001337.1	Brachyspira hyodysenteriae WA1, complete genome	675	475	71%	3e-131	81%	
CP001844.2	Staphylococcus aureus 04-02981, complete genome	653	2370	87%	5e-111	76%	
CP000029.1	Staphylococcus epidermidis RP62A, complete genome	653	2420	87%	5e-111	76%	
CP000056.1	Streptococcus pyogenes MGAS5180, complete genome	368	2208	71%	2e-130	78%	
AE017198.1	Lactobacillus johnsonii NCC 533, complete genome	340	1049	90%	4e-92	75%	
AF181673.1	Stealth virus 1 clone 3B43, genomic sequence	294	294	49%	3e-78	80%	
AF043706.1	Stealth virus 1 clone 3B43.T7	292	292	49%	1e-77	80%	

Figura 7.6. Resultados del análisis de BLAST-n frente a la base de datos de "dsDNA viruses, no RNA stage

Los resultados mostrados aportan evidencias de la presencia de un **virus con genoma quimérico**, compatible con descripciones previas de los grandes virus de DNA núcleo-citoplasmáticos. Una mayor descripción genética de este virus es necesaria para su filiación.

Este hallazgo, doble ya que por un lado se aisla una AVL no identificada hasta el momento (cepa "No A No N") y un **endosimbionte viral** (virus quimérico), amerita la realización a la brevedad de otro trabajo de Tesis Doctoral, debido a su potencial rol en la salud humana y/o animal.

CONCLUSIONES GENERALES

- Durante el tiempo en que se realizó este trabajo de tesis se anlizaron un total de 275 muestras de aguas de diferentes fuentes, aislando especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* en el 92,6% de los casos.

- Nuestros hallazgos apoyan la denominación de ubicuista para estas AVL.

- Demostramos su resistencia y permanencia frente a condiciones climáticas extremas, y su presencia tanto en aguas tratadas por cloración, como en aguas sin ningún tratamiento.

- La metodología de aislamiento en ANN descripta por Page en 1976, es la que se utiliza en la actualidad, y las que nos permitió identificar al género *Acanthamoeba* como el predominante en las aguas del Sudoeste Bonaerense, en la localidad de Sarmiento, provincia del Chubut, y en las provincia de Argentina cuyas aguas fueron analizadas.

- En el periodo 2009-2012 re recibieron 4 casos de posible QA, confirmándose *Acanthamoeba* como agente etiológico en dos de ellos. Esto demuestra la importancia de considerar estos agentes como alternativa ante el diagnostico diferencial y de implementar técnicas de aislamiento para confirmación del mismo; ya que un diagnóstico rápido y certero permite un tratamiento efectivo y previene acciones drásticas como la enucleación o el trasplante de córnea. Este tipo de diagnóstico de certeza, no requiere de laboratorios de alta complejidad.

- El conocimiento de la presencia de estos parásitos en el ambiente que nos rodea, nos obliga como profesionales de la salud a alertar a los usuarios de lentes de contacto sobre el uso y cuidados adecuados de las mismas, con el objeto de que disminuyan las posibilidades de contraer queratitis por *Acanthamoeba* o por cualquier otro agente.

- Se estudió la resistencia de las cepas aisladas frente a diferentes desinfectantes y a soluciones multiuso para limpieza de lentes de contacto, demostrando la elevada resistencia que estos microorganismos presentan a todas las sustancia testeadas, lo cual también concuerda con la bibliografía consultada.

- Para su análisis ultraestructural se modificó la técnica publicada por Costamagna y col., 2001, siendo adecuada para el estudio de estos protozoos. El análisis de las microfotografías obtenidas mostró que la ultraestructura de estos protozoos no difiere significativamente de la de otras células eucariotas. A su vez estas imágenes permitieron la visualización de endosimbiontes y partículas virales en la cepa denominada no A, no N, que derivaron hacia nuevas líneas para estudios futuros. Ultraestructuralmente se confirmó la presencia de una gruesa pared quística, aparentemente responsable de su resistencia, y se detectó, por Cromatografía Gaseosa, la presencia de trehalosa; lo que significaría una ventaja biológica para resistir a condiciones de estrés, lo que también sienta las bases para estudios más profundos que escapan a los objetivos de esta tesis.

- Si bien la implementación de técnicas de biología molecular, PCR, resultó ser uno de los objetivos más difíciles de cumplir de esta tesis dada la complejidad de su puesta a punto, se logró confirmar la ubicación taxonómica de 59 aislamientos, sentando las bases para futuras investigaciones.

- Con este trabajo se demuestra, entonces, que el género *Acanthamoeba* es el aislado con mayor frecuencia en diferentes aguas de la ciudad de Bahía Blanca, Sarmiento y otras provincias muestreadas.

- Se deterctó la presencia de Trehalosa por cromatografía gaseosa, en quiestes, lo que estaría relacionado con la gran resistencia, de *Acanthamoeba*, en medio ambiente extremo.

- Se demostró presencia de un virus quimérico en una cepa de AVL, con características diferentes a *Acanthamoeba* y *Naegleria*, cepa que fue denominada *No A No N*, lo que deja abierto un camino para nuevos estudios en AV.

PRODUCTIVIDAD DEL TRABAJO DE TESIS

1. Publicaciones en Revistas con referato

B. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular, en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Autores: **Gertiser ML**, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Lujan H, Occhionero M, Paniccia L, Visciarelli E, Costamagna SR. *Revista Argentina de Microbiología*, Volumen 42, N° 2, abril-junio 2010.

C. Aislamiento de *Acanthamoeba* spp. de piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Autores: **Gertiser ML**, Visciarelli E, Basabe N, Perez MJ, Costamagna SR. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, Volumen 44(4): 697-703; 2010.

D. *Acanthamoeba* spp.: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre". Autores: Costamagna SR, **Gertiser ML**, Visciarelli EC, Basabe N, y Felice V. *Salud y Ciencia*, Volumen 8, Nº 17; 2010.

E. Ultraestructura de *Acanthamoeba* sp. (Amebozoa, Acanthamoebidae). Autores: **Gertiser ML**, Visciarelli E, Costamagna SR. *RevA rg Parasitol*, 1 (3): 28-39, 2013.

2. Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales

A. Visciarelli Elena, Costamagna Sixto Raúl, Pérez María José, **Gertiser María Laura**, Basabe Norma, Díaz Alejandra, Lucchi Leandro. Investigación de Amebas de Vida Libre (AVL) en piscinas cubiertas de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina". IIIer Simposio Internacional de Epidemiología. Buenos Aires, 20 al 30 de noviembre de 2007.

B. **Gertiser, María Laura**; Visciarelli, Elena; Costamagna, Sixto Raúl; Basabe, Norma; Pérez, María José y Díaz, Alejandra. Amebas de Vida Libre en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. VIII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Rosario, 2 al 6 de noviembre de 2008. Revista Médica de Rosario, vol 74, supl. 1. 2008. ISSN: 0327-5019

C. **Gertiser María Laura**, Costamagna Sixto Raúl, Visciarelli Elena, Basabe Norma, Lucchi Leandro. *Acanthamoeba* spp: Clasificación por Grupos Morfológicos de los aislamientos de piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina.VIII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Rosario, 2 al 6 de noviembre de 2008. Revista Médica de Rosario, vol 74, supl. 1. 2008. ISSN: 0327-5019

D. Costamagna Sixto Raúl, Giagante Erna, Sgattoni Enrique, Basabe Norma, **Gertiser María Laura**, Visciarelli Elena, Paniccia Laura, Occhionero Marcelo. Queratitis por *Acanthamoeba* sp. VIII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Rosario, 2 al 6 de noviembre de 2008. Revista Médica de Rosario, vol 74, supl. 1. 2008. ISSN: 0327-5019

E. Costamagna Sixto Raúl, **Gertiser María Laura**, Visciarelli Elena. Ultraestructura de *Acanthamoeba* sp. (Protozoa, Amoebida). Vto Congreso Argentino de Parasitología, La Plata, 25-28 de marzo de 2009. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Supl. 1. 180. ISSN: 1851-7064.

F. **Gertiser María Laura**, Costamagna Sixto Raúl, Visciarelli Elena, Basabe Norma, Lucchi, Leandro. Resistencia al cloro de quistes de *Acanthamoeba* spp. Vto Congreso Argentino de Parasitología, La Plata, 25-28 de marzo de 2009. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Supl. 1. 181. ISSN: 1851-7064.

G. **Gertiser María Laura**; Basabe Norma; Rivero Fernando; Pérez María josé; Jensen Oscar; Visciarelli Elena, Lujan Hugo, Costamagna Sixto Raúl. Morfología, morfometría y tipificación molecular de amebas de vida libre aisladas en el Sudoeste bonaerense y en Chubut, Argentina. Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense. 4-5 de diciembre de 2009. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. Rev AMBB, Vol 19(supl.1) pág. 30.

H. **Gertiser María Laura**, Felice Vanina, Perez María, Visciarelli Elena,Costamagna Sixto, Basabe Norma, Jensen Oscar, Aislamiento de Amebas de Vida Libre en aguas

del curso inferior del Rio Senguer, Chubut, Argentina. XXIV Reunión de la Sociedad Argentina de Protozoología. Ascochinga, Córdoba, Argentina. Rev. Facultad Cs. Médicas. Vol 67 Supl. 2/2010: 72-73

I. **Gertiser María L**., Visciarelli Elena C., Felice Vanina, Costamagna Sixto R. Eficacia de soluciones comerciales multiuso para lentes de contacto frente a quistes de *Acanthamoeba*. XX Congreso FLAP, Bogotá, Colombia, 2011.

J. López José Luis, **Gertiser María Laura**, Jensen Oscar, Visciarelli Elena, Costamagna Sixto Raúl. Presencia de un virus quimérico en ameba de vida libre (avl) aislada de aguas recreativas. X Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires 26 al 29 de setiembre de 2011.

K. Lucchi Leandro, **Gertiser María L**, Visciarelli Elena y Costamagna Sixto Raúl. Detección de Trehalosa en quistes de *Acanthamoeba* spp. por Cromatografía Gaseosa. IX Congreso Argentino de Protozoología. Mar del Plata, 10 al 12 de noviembre de 2011. Revista Médica de Rosario 77 (SUPL 1), 2011. S67.

L. **Gertiser María Laura**, Visciarelli Elena y Costamagna Sixto Raúl. Resistencia de quiestes de *Acanthamoeba polyohaga* frente a diluciones de etanol. VI Congreso Argentino de Parasitología. Bahía Blanca, 17-19 de octubre de 2012. Rev Arg Parasitol, Vol 1(1):172. ISSN: 2313-9862.

M. **Gertiser María Laura**, Visciarelli Elena, Basabe Norma, Giagante Erna, Sgattoni Enrique, Lucchi Leandro y Costamagna Sixto Raúl. Queratitis de origen parasitario por *Acanthamoeba* en Bahía Blanca, Argentina. Caso Clinico. VI Congreso Argentino de Parasitología. Bahía Blanca, 17-19 de octubre de 2012. Rev Arg Parasitol, Vol 1(1):258. ISSN: 2313-9862.

N. Costamagna Sixto Raúl, **Gertiser María Laura**, Visciarelli Elena, Randazzo Viviana y Basabe Norma. Amebas de Vida libre, aislamientos de *Acanthamoeba* en Argentina y técnicas para su estudio (directo e indirecto). XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología, Guayaquil (Ecuador), 6 al 9 de octubre de 2013

BIBLIOGRAFIA

1. Adekambi T, Ben Salah S, Khlif M, Raoult D, Drancourt M (2006). Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. Appl. Environ. Microbiol.72:5974–5981.
2. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA *et al* (2005). The new higherlevel classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol 52: 399–451.
3. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE *et al* (2012), The Revised Classification of Eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology, 59: 429–514. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
4. Aduriz MA, Gargano AO, Chimeno P, Saldungaray MC, Conti VP (2003). Caracterización de los agrosistemas predominantes de la cuenca alta del Río Sauce Grande. INTA. ISSN 0325 – 8718
5. Ahmad AF, Andrew PW, Kilvington S (2011). Development of a nested PCR for environmental detection of the pathogenic free-living amoeba Balamuthia mandrillaris. J Eukaryot Microbiol; 58:269–71.
6. Ahmad AF, Heaselgrave W, Andrew PW, Kilvington S (2013), The In Vitro Efficacy of Antimicrobial Agents Against the Pathogenic Free-Living Amoeba *Balamuthia mandrillaris*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 60: 539–543. doi: 10.1111/jeu.12062
7. Aksozek A, McClellan K, Howar K, Niededrekorn JY and Alizadeh H (2002). Resistence of *Acanthamoeba castellani* cysts to physical, chemical and radiological conditions. J Parasitol. 88:621-623
8. Aksozek K, McClellan K, Howard J, Niederkorn Y, and Alizadeh H (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. *J. Parasitol.,* 88(3): 621–623.
9. Allen PG, and Dawidowicz EA (1990). Phagocytosis in *Acanthamoeba.* I. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. J. Cell. Physiol. 145:508–513.
10. Alsan, S., Sissons, J., Dudeley, R., Khan, NA., 2005. Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. Prasitol. Res. 96, 402-409.
11. Armstrong, M (2000). The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. Infect. Dis. Rev. 2:65–73.
12. Auran JD, Starr MB, and Jakobiec FA (1987). *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. Cornea 6:2–26.
13. Auran JD, Starr MB, Jokobiec FA (1997). *Acanthamoeba* keratitis: a review of the literature.Cornea; 6: 2-26.
14. Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G (2006) Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. BMC Evol Biol 6:109
15. Bacon A S, Frazer DG, Dart JK, Matheson M, Ficker LA, and Wright P. (1993). A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984–1992. Eye 7:719–725.

16. Baquero RA, Reyes-Batlle M, Nicola GG, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Guillermo Esteban J. et al (2014). Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. Pathog Glob Health., 108:206-11.
17. Baron D, Danglot C and Vilagines R (1980). Role of a free-living amoeba from wáter, *Acanthamoeba castellanii*, in transport of naked or enveloped animal viruses. C R Seances Acad Sci D. 291(7): 629-632.
18. Baverstock, PR, Illana S, Christy PE, Robinson RS, Johnson AM. (1989). srRNA evolution and phylogenetic relationships of the genus Naegleria (Protista: Rhi-' zopoda). Mol. Biol. Evol. 6:243-257.
19. Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK, Seal DV, Grimason AM (2003). Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contac lenses: a new risk factor for infection? Ophthalmol; 110 (4): 765-771.
20. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F (2007) Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. Parasitol Res 100:1249–1256
21. Behm CA (1997). The role of trehalose in the physiology of nematodes. Int. J. Parasitol. 27, 215 – 229.
22. Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray J-P & Raoult D (2006). Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. Emerg Infect Dis 12: 248–255.
23. Bermudez G. Una ameba le comió la cornea: Una mujer lavo una lente de contacto con agua de la canilla y un parasito le infecto el ojo. La Nueva Provincia. 07/04/2010. Disponible en: http://www.lanueva.com/archivo/nota/c58313ded7/6/58009.html
24. Booton GC, Schuster FL, Carmichael JR, et al (2003). Balamuthia mandrillaris: identification of clinical and environmental isolates
25. Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA (2005). Identification and distribution of Acanthamoeba species genotypes associated with nonkeratitis infections. J Clin Microb, 43:1689-93.
26. Booton, GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal D, Houang E, Lam D, Byers TJ, Fuerst PA. (2002). 18S rDNA Sequence Typing and Tracking of *Acanthamoeba* sp. from Corneal Scrapes, Contact Lenses, Lens Cases and Home Water Supplies of *Acanthamoeba* Keratitis Patients in Hong Kong. J. Clinical Microbiology 40: 1621-1625**.**
27. Bowers B, Korn ED (1968). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii.* I. The trophozoite. J Cell Biol; 39: 95-111.
28. Bowers B, Korn ED (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. J. Cell Biol. 41:786–805.
29. Bowers B, Korn ED (1973). Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba* castellanii. J Cell Biol,59:784-91
30. Brandt FH Ware DA and Visvesvara GS (1989). Viability of *Acanthamoeba* Cysts in Ophthalmic Solutions. Appl. Environ. Microbiol.55: 1144-1146

31. Bravo FG, Cabrera J, Gottuzo E & Visvesvara GS (2006). Cutaneous manifestations of infection by free-living amebas. Tropical Dermatology (Tyring SK, Lupi O & Hengge UR, eds), pp. 49–55. Elsevier Inc., Philadelphia.
32. Bravo FG, Seas C (2012). Balamuthia mandrillaris amoebic encephalitis: an emerging parasitic infection. Curr Infect Dis Rep., 14:391-6.
33. Brindley N, Matin A, Khan NA (2009). *Acanthamoeba* castellanii: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. Expe Parasitol 2009, 121:254-6.
34. Brown MW, Spiegel FW, Silberman JD (2007). Amoeba at attention: phylogenetic affinity of *Sappinia pedata*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54: 511–519
35. Brown MW, Spiegel FW, Silberman JD (2007). Amoeba at Attention: Phylogenetic Affinity of Sappinia pedata. J. Eukaryot. Microbiol., 54(6), pp. 511–519.
36. Brown MW, Spiegel FW, Silberman JD (2007). Amoeba at Attention: Phylogenetic Affinity of Sappinia pedata. J. Eukaryot. Microbiol., 54(6), pp. 511–519.
37. Brown T J, and Cursons RT (1977). Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. Scand. J. Infect. Dis. 9:237–240.
38. Burger RM, Franco RJ and Drlica K (1994). Killing Acanthamoebae with polyaminopropyl biguanide: quantitation and kinetics. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 886-888.
39. Butt C G, Baro C, Knorr R W (1968). *Naegleria* (sp) identified in amebic encephalitis. Am J Clin Pathol; 50: 568-74.
40. Butt C G. Primary amebic meningoencephalitis (1966). N Engl J Med; 274: 1473-6.
41. Byers, T.J., 1979. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. Int. Rev. Cytol. 61, 283–338.
42. Byers, TJ, Hugo, ER, Stewart, VJ. (1990). Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (a review). Journal of Protozoology. 37(4): 17S-25S.
43. Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, González AC, Guerra H, Gotuzzo E, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2014). Genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in Peru. Acta Tropica, Volume 130, Pages 7–10
44. Cabello-Vílchez AM, Reyes-Batlle M, Montalbán-Sandoval E, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Elias-Letts R, Guerra H, Gotuzzo E, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Maciver SK, Valladares B, Lorenzo-Morales J (2014). The isolation of Balamuthia mandrillaris from environmental sources from Peru. Parasitology Research. July 2014, Volume 113, Issue 7, pp 2509-2513
45. Callicott J H J (1968). Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the *Hartmannella* (*Acanthamoeba*) – *Neagleria* group. Am J Clin Pathol; 49: 84-91.
46. Camarata E (1982). La bahía Blanca, área de contacto entre ambientes diferenciados. Atlas Total de la República Argentina N° 7
47. Campo, A.M., M.B. Ramos y P.A .Zapperi (2008) Análisis de las variaciones anuales de precipitación en el suroeste bonaerense, Argentina. (egal2009.easyplanners.info/area07/7085_Campo_Alicia_M_.pdf)

48. Capelli de Steffens, A.M, M. C. Piccolo y A.M. Campo de Ferreras (2006) Clima urbano de Bahía Blanca. Revista Universitaria De Geografia – Vol. 15:183-186
49. Cary LC, Maul E, Potter C, et al (2010). *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis: survival of a pediatric patient. Pediatrics. In: Jeremy Farrar, Peter Hotez, Thomas Junghanss, Gagandeep Kang, David Lalloo, Nicholas J. White Manson's Tropical Diseases. Elsevier Health Sciences, 2013 - 1530 páginas
50. Castellani A (1930). An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. J Trop Med Hyg 33: 160.
51. Castrillón JC, Orozco LP (2013). *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista chilena de infectología*, *30*(2), 147-155
52. Centeno M, F. Rivera, Cerva L, Tsutsumi V, Gallegos E, Calderón A, Ortíz R, Bonilla P, Ramírez E, Suárez G (1996). *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitisand bronchopneumonia. Archives of Medical Research 27:579-586.
53. Cermeño JR, Hernandez I, Yasin HE; Tinedo R, Sanches R, Pérez G et al (2006). Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Eidemiological study in Anzoategui State, Venezuela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 39 (3): 264-268
54. Cerva L, Kasprzak W and Mazur T (1982). *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plant. J Hyg Epidemiol Microbiol Inmunol; 26: 152-61.
55. Cerva L, Novak K (1968 a). Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. Science; 160: 92.
56. Cerva L, Novak K, Culbertson C G (1968b). An outbreak of acute, fatal amebic meningoencephalitis. Am J Epidemiol; 88: 436-44.
57. Chambers, J.A., Thompson, J.E., 1972. A scanning electron microscopy study of the excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. Exp. Cell. Res. 73, 415–421.
58. Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., Gonzáles-Robles, A., Bonilla, P., Martínez-Palomo, A., 2005. Ultrastructural Study of Encystation and Excystation in *Acanthamoeba castellanii.* J. Eukaryot. Microbiol. 52 (2), 153-158.
59. Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Cedillo-Rivera, R., Bonilla, P., Martínez-Palomo, A., 2007. Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. Parasitol. Res. 100, 1169–1175
60. Chlapowski FJ and Band RN (1971). Assembly of lipids into membranes in *Acanthamoeba palestinensis*. II. The origin and fate of glycerol- 3 H--labeled phospholipids of cellular membranes. J Cell Biol. Sep; 50(3):634-51.
61. Chlapowski FJ and Band RN (1971). Assembly of lipids into membranes in *Acanthamoeba palestinensis*. II. The origin and fate of glycerol- 3 H--labeled phospholipids of cellular membranes. J Cell Biol. Sep; 50(3):634-51.
62. Clark, CG, Cross GAM. (1988). Small-subunit ribosomal RNA sequence from Naegleria gruberi supports the polyphyletic origin of amebas. Mol. Biol. Evol., 5:512–518.

63. Cogo PE, Scaglia M, Gatti S, Rossetti F, Alaggio R, Laverda AM, Zhou L, Xiao L &Visvesvara GS (2004.) Fatal Naegleria fowleri meningoencephalitis, Italy. Emerg Infect Dis 10: 1835–1837.
64. Cope JR, Raoult CR, Hill VR, Sokol T, Causey JJ, Yoder JS, Mirani G, Mull B, Mukerjee KA, Narayanan J, Doucet M, Qvarnstrom Y, Poole CN, Akingbola OA, Ritter JM, Xiong Z, da Silva AJ, Roellig D, Van Dyke RB, Stern H, Xiao L, and Beach MJ (2015). The First Association of a Primary Amebic Meningoencephalitis Death With Culturable *Naegleria fowleri* in Tap Water From a US Treated Public Drinking Water SystemClin Infect Dis. first published online January 16, doi:10.1093/cid/civ017
65. Corsaro D, Venditti D (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). Parasitol Res, 107:233-8.
66. Corsaroa D, Michelb R, Walochnikc J, Mullerd KD, Greuba G (2010). Saccamoeba lacustris, sp.nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new loboseamoeba, parasitized by the novel chlamydia 'Candidatus Metachlamydia lacustris' (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). European Journal of Protistology 46: 86–95
67. Costamagna SR, Basabe N, Randazzo V, Prat MI, Visciarelli E y Lucchi L. El test de inmunofluorescencia como herramienta para el diagnóstico de Acanthamoebosis. X Congreso Argentino de Protozoología y enfermedades parasitarias. 16 al 18 de noviembre de 2014. Mar del Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina.
68. Costamagna SR, Sorrivas V, Prado Figueroa M (1996). Processing *Trichomonas vaginalis* for scanning electron microscopy. Microscopy Res Techn; 35: 357-8.
69. Costamagna, S.R., Prado Figueroa, M., (2001). On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocitosis and hidrogenosomes. Parasitol al día. 25 (3-4), 100-108.
70. Cuevas M, Smoje G, Jofré L, Ledermann W, Noemí I, Berwart F, et al (2006). Meningoencefalitis granulomatosa por Balamuthia mandrillaris: Reporte de un caso y revisión de la literatura. Rev Chil Infect; 23 (3): 234-9
71. Culbertson CG, Smith JW & Miner JR (1958). *Acanthamoeba* observation on animal pathogenicity. Science 127: 1506.
72. Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK & Miner JR (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. Am J Pathol 35: 185–197.
73. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D (1980) Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. Infect Immun, 29:401-7.
74. Cursons RTM, Brown TJ, and Keys EA (1980). Effect of Disinfectants on Pathogenic Free-Living Amoebae: in Axenic Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 40(1): 62-66.
75. D´Alessandro LP, Rosetti S (2007). Queratitis por *Acanthamoeba* en un paciente usuario de solución multiproposito de limpieza de lentes de contacto: primer caso en Argentina. Oftalmol Clin Exp. 1:29-31.
76. D'Aversa G, Stern GA, and Driebe WT (1995). Diagnosis and successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Arch. Ophthalmol. 113:1120–1123.

77. da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F (2009). Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. Interdiscip Perspect Infect Dis:251406
78. Danes L and Cerva L (1981). Survival of polioviruses and achoviruses in *Acanthamoeba castellanii* cultivated in vitro. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 25(2): 169-174
79. De Jonckheere FJ (2007). Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). European Journal of Protistology 43: 9–15
80. De Jonckheere J, Van de Voorde H (1977). The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made termal water. Am. J. trop. Med. Hyg. 26: 10-15.
81. De Jonckheere J; Van de Voorde H. (1976) Differebces in destruction of Cysts of Pathogenic and Nonpathogenic Naegleria and *Acanthamoeba* by Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 31(2): 294-297.
82. De Jonckheere JF (1987). Epidemiology. *In* Amphizoic amebae: human pathology, E. G. Rondanelli Ed. Piccin Nuova Libraria. Padua. p. 127-147.
83. De Jonckheere JF (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus Naegleria. Acta Protozool. 41, 309–342.
84. De Jonckheere JF (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus Naegleria. Protist 155: 89–103.
85. De Jonckheere JF, (2014), What do we know by now about the genus Naegleria?, Experimental Parasitology, Volume 145, Supplement,Pages S2-S9
86. Deetz TR, Sawyer MH, Billman G, Schuster FL &Visvesvara GS (2003). Successful treatment of Balamuthia amoebic encephalitis: presentation of two cases. Clin Infect Dis 37:1304–1312.
87. Derreumaux AL, Jadin JB, Willaert E and Moret R (1974). Action du chlore sur les amibes de l´eau. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54:415-428.
88. Derrick E H (1948). A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoon closely resembling, Eif not identical with *Iodamoeba buetschlii*. Trans R Soc Trop Med Hyg; 42: 191-8.
89. Deslauriers R, Jarrell HC, Byrd RA, Smith ICP (1980). Observation by 13c NMR of metabolites in differentiating amoeba.Trehalose storage in encysted *Acanthamoeba castellanii.* FEBS Letters; 118: 185-190
90. Dieffenbach CW, Dveksler GS. Setting up a PCR Laboratory. Genome Res 1993; 3:S1-S7
91. Donzis PB, Mondino BJ, Weissman BA, and Bruckner DA (1987). Microbial contamination of contact lens care systems. Am. J. Ophthalmol. 104:325–333.
92. Drozanski W (1956). Fatal bacterial infection in soil amoebae. Acta Microbiol Pol 5: 315–317.
93. Dunnebacke TH, Schuster FL, Yagi S & Booton GC (2004). *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. Microbiology 150: 2837–2842.
94. Dykova´I, Bohacova L, Fialaa I, Machackova B, Peckova H, Dvorakova H(2005). Amoebae of the genera Vannella Bovee, 1965 and Platyamoeba Page, 1969

isolated from fish and their phylogeny inferred from SSU rRNA gene and ITS sequences. European Journal of Protistology 41:219–230.

95. Espinal D, Díaz R (2012). Meningoencefalitis por amiba de vida libre reporte de un caso. Medicina. Disponible en: http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/2441
96. Feingold JM, Abraham J, Bilgrami S, Ngo N, Visvesara GS, Edwards RL, et al (1998). *Acanthamoeba* meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant.; 22:297–300.
97. Fowler M, Carter RF (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: A preliminary report. Br Med J. 2: 740-3.
98. Fritsche TR, Horn M, Wagner M, Herwig RP, Schleifer KH & Gautom RK (2000). Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbiol 66: 613–619.
99. Gallegos-Neyra E, Calderón Vega A, Garduño A (2012).Amibas de vida libre patógenas en playas de Veracruz, México. Revista Latinoamericana de Microbiología 65:148-150
100. Gallegos-Neyra EM, Lugo-Vázquez A, Calderón-Vega A, Sánchez-Rodríguez MR, Mayén-Estrada R, Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México, Revista Mexicana de Biodiversidad, Volume 85, Supplement 1, Pages 10-25
101. Gast RJ (2001). Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. J Eukaryot Microbiol 48: 609–615.
102. Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Bokowski J, Chaljub G, Nauta HW & Visvesvara GS (2001). Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA 285: 2450–2451.
103. Gertiser ML, Basabe NE, Rivero F, y col (2009). Morfología, morfometría y tipificación molecular de amebas de vida libre aisladas en el sudoeste bonaerense y en Chubut, Argentina. Primeras Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense. Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca 19(Supl.1):30-31
104. Gertiser ML, Costamagna SR, Visciarelli EC, Basabe NE & Lucchi LD (2009). Resistencia al cloro de quistes de *Acanthamoeba* spp*V Congreso Argentino de Parasitología*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Supl. 1. 180. ISSN: 1851-7064. (Pag. 181)
105. Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E y col (2010). Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular, en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. Volumen 42, N° 2, abril-junio 2010.
106. Gertiser ML, Visciarelli EC, Costamagna SR y col (2008). Amebas de vida libre en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Rev Méd Rosario (Supl.1)74:35-36.
107. Gómez-Couso H, Paniagua-Crespo E and ares-Mazás E (2007). *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. Parasitol Res. 100: 1151-1154.

108. Gonzalez Moccia HJ, Iesari YI, Luchessi G (2009). Queratitis por *Acanthamoeba*. Caso clínico. Revista electrónica de PortalesMedicos.com. Publicado el 14/04/09. Disponible en: http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/1425/1/Queratitis-por-Acanthamoeba-Caso-clinico.html
109. Goodfellow LP, Belcher JH, Page FC (1974). A light- and electron-microscopical study of *Sappinia diploidea*, a sexual amoeba. Protistologica 2, 207–216.
110. Gornik K, Kuzna-Grygiel W (2004). Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. Ann Agric Environ Med 11:233–236
111. Gorodner JO and Fernández GJ (2006). Detección de Amebas de vida libre en aguas de uso recreativo. Disponible en: www.unne.edu.ar/med_regional/boletin/2006/parasitologia_deteccionamebas.pdf.
112. Greub G & Raoult D (2004). Microorganisms resistant to freeliving amoebae. Clin Microbiol Rev 17: 413–433.
113. Guisasola F (2011). Queratitis por *Acanthamoeba*: análisis de casos en el Hospital Oftalmológico Santa Lucía (2009-2010). Arch. Oftalmología de Buenos Aires 82: 25-29.
114. Gupta D, Panda GS, Bakhshi S (2008). Successful treatment of *Acanthamoeba* meningoencephalitis during induction therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer. 50:1292–3.
115. Gutiérrez JC, Callejas S, Borniquel S, Benítez L, Martín-González A (2001). Ciliate crytobiosis: a microbial strategy against enviromental starvation. Int Microbiol; 4: 151-157.
116. Gutiérrez Y (2000). Free-Living Amebae. En: Y. Gutiérrez (Ed). Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations. Ed. Oxford University Press. New York 2000; p 114-42.
117. Gutiérrez, J.C., Callejas, S., Borniquel, S., Benítez, L., Martín-González, A., 2001. Ciliate crytobiosis: a microbial strategy against enviromental starvation. Int. Microbiol. 4, 151-157.
118. Hartmann M, Nägler K, (1908). Copulation bei Amoeba diploidea n. sp. Mit Selbständigbleiben der Gametenkerne während des ganzen Lebenszyklus. Sitzungsbericht der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin 5, 112–125.
119. Hewett MK, Robinson BS, Monis PT & Saint CP (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* ,Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). Acta Protozool 42: 325–329.
120. Hoffmann R, Michel R (2001). Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation supply of drinking water. Inst J Hyg Environ Health, Mar; 203: 215-9.
121. Hughes R and Kilvington S (2001). Comparison of Hydrogen Peroxide Contact Lens Disinfection Systems and Solutions against *Acanthamoeba polyphaga*. Antimicrob. Agents. Chemother. 45:2038-2043.

122. Illingworth CD, Cook SD, Karabatsas CH, and Easty LD (1995). *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. Br. J. Ophthalmol. 79: 1078–1082.
123. Instituto nacional de Salud (1996). Amebas de Vida libre (AVL) en la Ciudad de Piura.2 (1):8
124. Itoh K, Yagita K, Nozaki T, Katano H, Hasegawa H, Matsuo K, Hosokawa Y, Tando S, Fushiki S (2015). An autopsy case of *Balamuthia mandrillaris* amoebic encephalitis, a rare emerging infectious disease, with a brief review of the cases reported in Japan. Neuropathology, 35: 64–69. doi: 10.1111/neup.12151
125. Jadin J, Williaert E, Compere F (1972). De la nécesité du contróle biologique des eaux potebles. Bull Acad Not Med; 156: 995-9.
126. Jager B V and Stamm WP (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. Lancet ii: 1343–1345.
127. Jaison PL, Cao Z, Panjwani N (1998). Binding of *Acanthamoeba* to (corrected) mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect to injury. Curr Eye Res; 17: 770-6
128. Jayasekera S, Sissons J, Tucker J, Rogers C, Nolder D, Warhurst D. et al (2004). Post mortem culture of Balamuthia mandrillaris from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular endothelial cells. J Med Microbiol., 53:1007-12.
129. John DT (1993). Oportunistically pathogenic free-living amoebae. *In* Parasitic Protozoa, J. P. Kreier y J. R. Baker (Eds.). Academic Press, Nueva York. p. 140-246.Journal of Water Health 8:71-82.
130. Johnson, AM, Fielke R, Christy PE, Robinson B, Baverstock PE. (1990). Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. J. Gen. Microbiol. 136: 1689- 1698.
131. Jung S, Schelper RL, Visvesvara GS & Chang HT (2003). *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an unusual clinical course and a favorable outcome. Arch Pathol Lab Med 128: 466–468.
132. Kao PM, Tung MC, Hsu BM, Chou MY, Yang HW, She CY, Shen SM (2013). Quantitative detection and identification of Naegleria spp. in various environmental water samples using real-time quantitative PCR assay. Parasitology Research, Volume 112, Issue 4, pp 1467-1474
133. Kemble SK, Lynfield R, DeVries AS, Drehner DM, Pomputius III WF, Beach MJ, Visvesvara GS, da Silva AJ, Hill VR, Yoder JS, Xiao L, Smith KE, and Danila R (2012). Fatal Naegleria fowleri Infection Acquired in Minnesota: Possible Expanded Range of a Deadly Thermophilic Organism. Clin Infect Dis. first published online January 11, doi:10.1093/cid/cir961
134. Kernoham J W, Magath T B, Schloss G T (1960). Granuloma of brain probably due to *Endolimax williamsi* (*Iodamoeba buetschlii*). Arch Pathol; 70: 576-80.
135. Khan NA (2001). Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. Current Microbiology 43:391-395.

136. Khan NA (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol. Rev. 30, 564-595.
137. Khan NA (2009). *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk. UK. ISBN: 978-1-904455-43-1.
138. Khan NA, Jarroll EL, Paget TA (2001). *Acanthamoeba* can be defferentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assay. Curr Microbiol; 43: 204-208.
139. Khan, N.A., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol. Rev. 30, 564-595
140. Khan, NA. 2009. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk. UK. Castellani A., 1930. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. J. Trp. Med. Hyg. 33,160.
141. Khanna V, Shastri BA, Anusha G, Mukhopadhayay C, Khanna R (2014). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literatura. Trop Parasitol. Jul-Dec; 4(2): 115–118. doi: 10.4103/2229-5070.138540
142. Khurana S, Hallur V, Goyal M, Sehgal R, Radotra B (2015). Emergence of balamuthia mandrillaris meningoencephalitis in India. Indian Journal of Medical Microbiology 33.2 (Apr-Jun 2015): 298-300.
143. Kiderlen AF & Laube U (2004). *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway. Parasitol Res 94: 49–52.
144. Kilvington S, Beeching JR, White GD (1991b). Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestión of whole cell DNA. Journal of Clinical Microbiology 29:310-314.
145. Kilvington S, Mann PG, Warhurst DC (1991ª). Pathogenic *Naegleria* amoebae in the waters of Bath, a fatality and its consequences. *In* Hot Springs of Bath, G. A. Kellaway (ed.).Bath City Council, Reino Unido. p. 89-96.
146. Kingston DC, Warhurst D (1969). Isolation of amoebae from the air. J Med Microbiol; 2: 27-36.
147. Köshler M, Leitner B, Blaschitz M, Michel R, Aspöck H, Walochnik J (2006). ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). Parasitol Res; 98: 86-93.
148. Kumar M, Jain R, Tripathi K, Tandon R, Gulati AK, Garg A, et al (2007). *Acanthamoebae* presenting as primary meningoencephalitis in AIDS. Indian J Pathol Microbiol. 50:928–30.
149. Laconte M Laura, Rivero Fernando, Lujan Hugo, Casero Rodolfo. 2013. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de amebas de vida libre (Acanthamoeba) obtenidas del medio ambiente y de pacientes con queratitis amebiana. (Disponible en: http://www.cobico.com.ar/wp-content/archivos/2013/07/Trabajo-de-investigacion-Bioq.-Laconte-Laura1.pdf). Ultimo acceso, setiembre de 2015.

150. La Scola B, Mezi L, Weiller PJ & Raoult D (2001). Isolation of Legionella anisa using an amoebic coculture procedure. J Clin Microbiol 39: 365–366.
151. Lares-Jiménez LF, Booton GC, Lares-Villa F, Velázquez-Contreras CA, Fuerst PA (2014). Genetic analysis among environmental strains of Balamuthia mandrillaris recovered from an artificial lagoon and from soil in Sonora, Mexico, Experimental Parasitology, Volume 145, Supplement, Pages S57-S61, ISSN 0014-4894, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.007.
152. Larkin DPF, Kilvington S and Dart JKG (1992). Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. Ophthalmol.99:185-191.
153. Latapie LB, Cremona G, Carrasco MA y col (2008). Queratitis inflamatoria por *Acanthamoeba* spp. Análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión. Parasitol Latinoam. 58: 159-65.
154. Latapie LB, Cremona G, Carrasco MA, Molina VE, Bozzini JP, Mariano ML (2003). Queratitis inflamatoria por *Acanthamoeba* spp. Análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión. Parasitol Latinoam; 58: 159-65.
155. Lau, G. W., D. J. Hassett, and B. E. Britigan. 2005. Modulation of lung epithelial functions by Pseudomonas aeruginosa. Trends Microbiol. 13:389–397.
156. Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, Kilvington S, Keys MF, Matheson MM, Dart JK, McGill JI & Watt PJ (1998). Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 1261–1265.
157. Levine N (1961). Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN
158. Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR & Russell AD (2001). Encystation in Acanthamoeba castellanii: development of biocide resistance. J Eukaryot Microbiol 48: 11–16.
159. López Cazorla A (2010). Alimentación De La Ictiofauna Del Río Sauce Grande, Provincia De Buenos Aires, Argentina. págs. 73 a 79. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS.
160. Lorenzo-Morales J, Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B (2013). Is Balamuthia mandrillaris a public health concern worldwide? Trends Parasitol; 29:483-8.
161. Lorenzo-Morales J, Coronado-Alvarez N, Martinez-Carretero E, Maciver SK and Valladeres B (2007). Detection of four adenovirus serotypes within wáter-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. Am J Trop Med Hyg. 77: 753-756.
162. Lorenzo-Morales J, Marciano-Cabral F, Lindo JF, Visvesvara GS, MacIver SK (2010). Pathogenicity of amoebae.Experimental Parasitology 126:2-3.
163. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martinez E, Valladares B (2005). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. Parasitol Res 95:273–277
164. Lucchesi O, Santos G, Tonelli R, Jercic Lara M, Carrizo LC, Salomon MC (2010). Presencia de A*canthamoeba* en muestras ambientales de Mendoza. Identificación

por Caracterización Morfológica y confirmación por técnica de PCR. Jornadas de Investigación 2010. Universidad Nacional de Cuyo. Disponible en: fcm.uncu.edu.ar/jornadas2010/index.php/articulos/view/97.
165. Maghsood AH, Sissons J, Rezaeian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA, (2005). *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran, and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. Journal of Medical Microbiology 54, 755–759
166. Marciano-Cabral F and Cabral G (2003). *Acanthamoeba* spp. As Agents of Disease in Humans. Clin Microbiol Rev; 16 (2): 273-307.
167. Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro ES (2010). Freeliving amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap wáter supplied by a municipal drinking water utility in the USA.
168. Martínez A J and Visvesvara G S (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amoeba. Brain Pathol; 7: 583-98.
169. Martinez AJ & Visvesvara GS (1997). Free-living amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol 7: 583–598.
170. Martinez AJ & Visvesvara GS (2001). *Balamuthia mandrillaris* infection (editorial). J Med Microbiol 50: 205–207.
171. Martínez AJ (1985). Free-living amebas: natural history prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Ratón. 156 p.
172. Martinez AJ, Schuster FL, Visvesvara GS (2001). Balamuthia mandrillaris: its pathogenic potential. J Eukaryot Microbiol. Suppl: 6S-9S.
173. Martínez AJ, Visvesvara GS (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathology 7:583-598.
174. Martínez Pérez JA, Gutiérrez M (1985). Introducción a la protozoología. Editorial TRILLAS. Primera edición. México.
175. Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Cabrera-Serra MG, Rancel F, Coronado-Alvarez NM, Piñero JE, Basilio Valladares B (2008). The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands and Spain. Journal of Medical Microbiology, 57, 1399–1404
176. Mattana A, Serra C, Mariotti E, Delogu G, Fiori PL and Cappuchelli P (2006). *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses. Eukaryot Cell. 5:665-671.
177. Mazur T, Hadas E, Iwanicka I (1995). The duration of the cysts stage and the viability and virulence of *Acanthamoena* isolates. Trop. Med. Parasitol; 46: 106-108.
178. McIntyre H J, Davies H, Hore Ta, Miller S H, Dufour Jp ; Ronson C W (2007). Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii and its role in desiccation tolerance. Applied and environmental microbiology vol. 73, no12, pp. 3984-3992.
179. Melo W (2004). Génesis del estuario de Bahía Blanca: Relación dinámica y morfogenética con su cuenca hidrográfica. Tesis Doctoral. Departamento de Geografía. Universidad Nacional del Sur. 284 pp.

180. Menghi, C; Caride, M y Gatta, C. *Acanthamoeba* sp.: un caso de queratitis no relacionada con el uso de lentes de contacto (2012). Rev. argent. microbiol, vol.44 (4): 275-277.
181. Merino L y Giusiano. Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos. 1ra. Edición, Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2011.
182. Michel R, Müller KD, Hauröder B, Zöller L (2006). Isolation of *Saccamoeba limax* simultaneously harboring both a *Chlamydia*-like endoparasite and a rod-shaped bacte-rium as endosymbionts. Endocytobiosis Cell Res. 17 (2), 171-179
183. Michel R, Müller KD, Hauröder B, Zöller L (2006). Isolation of *Saccamoeba limax* simultaneously harboring both a *Chlamydia*-like endoparasite and a rod-shaped bacte-rium as endosymbionts. Endocytobiosis Cell Res. 17 (2), 171-179
184. Michel R, Muller K-D, Zoller L, Walochnik J, Hartmann M & Schmid E-N (2005). Free-living amoebae serve as a host for the Chlamydia-like bacterium *Simkania negevensis*. Acta Protozool 44: 113–121.
185. Michel R, Wylezich C, Haurader B, Smirnov AV (2006/7). Phylogenetic position and notes on the ultrastructure of *Sappinia diploidea* (Thecamoebidae). Protistology 4 (4), 319-325.
186. Michel R, Wylezich C, Haurader B, Smirnov AV (2006/7). Phylogenetic position and notes on the ultrastructure of *Sappinia diploidea* (Thecamoebidae). Protistology 4 (4), 319-325.
187. Michel R, Wylezich C, Hauröder B, Smirnov AV (2006). Phylogenetic position and notes on the ultrastructure of *Sappinia diploidea* (Thecamoebidae). *Protistology* 4: 319–325
188. Mogoa E. y col. (2010). *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. Exp. Parasitoldoi:10.1016/j.exppara.2009.12.005
189. Moore MB and McCulley JP (1989). *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses: six consecutive cases of successful management. Br. J. Ophthalmol. 73:271–275.
190. Moore MB, McCulley JP, Luckenbach M, Gelender H, Newton C, McDonald MB, and Visvesvara GS (1985). *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. Am. J. Ophthalmol. 100:396–403.
191. Moore MB, McCulley JP, Newton C, Cobo LM, Foulks GN, O'Day DM, Johns KJ, Driebe WT, Wilson LA, Epstein RJ, et al (1987). *Acanthamoeba* keratitis. A growing problem in soft and hard contact lens wearers. Ophthalmology 94:1654–1661.
192. Moriarty P, Burke C, McCrossin D, Campbell R, Cherian S, Shekeeb Shahab M, Visvesvara GS, Nourse N (2013). Balamuthia mandrillaris Encephalitis: Survival of a ChildWith Severe Meningoencephalitis and Review of the Literature. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society pp. 1–6, 2013. DOI:10.1093/jpids/pit033
193. Moura H (1980). Amebas de vida livre em piscinas: isolamento, identificação, potencial patogénico (Disertación de Maestría). Río de Janeiro, Fundación Oswaldo Cruz.

194. Moussa M, Tissot O, Guerlotté J, De Jonckheere JF, Talarmin A (2015). Soil is the origin for the presence of Naegleria fowleri in the thermal recreational waters. Parasitology Research., Volume 114, Issue 1, pp 311-315
195. Mullis KB, Faloona FA. Specific síntesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: 335-350.
196. Muñoz V, Reyes H, Astorga LB, Rugiero PE, Del Río S, and TocheP (1993). Amibas de vida libre en habitats de aguas dulces de Chile. Parasitol. Dia. 17(3/4):147-52.
197. Muñoz V, Reyes H, Toche P, Cárcamo C, Gottlieb B (2003). Isolation of free-living amoebae form public swimming pool in Santiago, Chile. Parasitol. Latinoam; 58: 106-111.
198. Nagington J, Watson PG, Playfair TJ, Mc Gill J, Jones BR, Steele ADM (1974). Amoebic infection of the eye. Lancet; 2:1537-40.
199. Nägler K (1909). Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amöben. Archiv für Protistenkunde 15, 1–53.
200. Nardin ME, Nagel AA, Escobar A, Mendez E (2008). Queratits por *Acanthamoeba* sp.: Nuestra experiencia. VIII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Rev Méd Rosario (supl.1) 74: 38-37.
201. Neff, R.J., 1957. Purification, axenic cultivation, and description of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. J. Protozool. 4, 176.
202. Neff, R.J., Benton, W.F., Neff, H., 1964. The composition of the mature cyst wall of the soil ameba *Acanthamoeba* sp. J. Cell. Biol. 23, 66A.
203. Niederkorn JY, Alizadeh A, Leher H, McCulley JP (1999). The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. Microb Infect; 437-43.
204. Niederkorn JY, Alizadeh H, Leher HF, and McCulley JP (1999). The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. Springer Semin. Immunopathol. 21:147–160.
205. Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebali M, Maghsood AH, Motevalli-Haghi A, Martín-Navarro CM, Farnia S, Valladares B, Rezaeian M (2009). Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. Experimental Parasitology 121: 242–245
206. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S (2010) Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. J Clin Microb, 48:4636-440.
207. Oddó DB (2006). Infeciones causadas por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomemclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. Rev Chil Infec; 23 (3): 200-214.
208. Page FC (1967). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J Protozool 14: 709–724.
209. Page FC (1976). An illustrated key to freshwater and soil amoebae: with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association, Publisher, p. 155.
210. Page FC (1976). An illustrated key to freshwater and soil amoebae: with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association, Publisher, p. 155.
211. Page FC (1988). A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK.

212. Page, F.C., 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J. Protozool. 14, 709-724.
213. Page, W.C., 1976. An ilustrated key to freshwater and soild amoebae, with notes on cultivation and ecology. Fresh. Boil. Ass. Sci. Publ. 34, 1-155
214. Panjwani N (2010). Pathogenesis of Acanthamoeba keratitis. Ocul Surf, 8:70-9.
215. Patras D, Andujar JJ (1966). Meningoencephalitis due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). Am J Clin Pathol; 46: 226-33.
216. Pérez de Galindo MV, Galindo M, Dorta A, Guzmán de R C, Wagner C, Vethencourt MA, Nessi A, Bermdúez A, Pérez de Suárez E (2013). Free Living Amoebas of *Acanthamoeba* and Naegleria genera in Venezuelan patients. http://hdl.handle.net/1807/63812
217. Perez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, Tufail A, Metheson M, Dart JKG (2003). Persistently culture positive *Acanthamoeba* keratitis; in vivoresistance and in vitro sensitivity. Ophthalmol, 110:1593-600.
218. Petzold EW, Himmelreich U, Mylonakis E, Rude T, Toffaletti D, Cox GM, Miller JL, Perfect JR Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2006 Oct; 74(10):5877-87.
219. Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compoundsJEADV18, 73–78
220. Polat ZA, Tepe B and Vural A (2007a). In vitro effectiveness of Thymus sipyleus subsp. Sipyleus var. sipyleus on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. Parasitol Res 101:1551–1555
221. Polat ZA, Vural A, Ozan F, Tepe B, Ozcelik S and Cetin A (2007b). In vitro evaluation of amoebicidal activity of garlic (Allium sativum) extract on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxix potencial on corneal cells. J Ocul Pharmacol Ther 24: 8-14
222. Proca-Ciobanu M, Lupascu GH, Petrovici A & Ionescu MD (1975). Electron microscopic study of a pathogenic Acanthamoeba castellani strain: the presence of bacterial endosymbionts. Int J Parasitol 5: 49–56.
223. Proszenyák A, Charnock C, Hedner E, larsson R, Bohlin L and Gunderser LL (2007). Synthesis, antimicrobial and antineoplastic activities for agelastine and agelasimine analogs with a beta-cyclotical derived substituene. Arch Pharm (Weinheim) 340 625-634.
224. Pushkarew BM (1913). Über die Verbreitung der Süsswasser protozoen durch die Luft. Arch Protistent 23: 323–362.
225. Pussard M (1966). Le genere *Acanthamoeba* Volkonsky 1931(Hartmannellidae-Amoebida). Protistologica 2: 71–93.
226. Pussard M, Pons R (1977). Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica 13: 557–610.
227. Pussard M, Pons R (1977)**.** Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida).Protistologica; 13**:** 557-610

228. Pussard M, Pons R (1977). Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica 13: 557–610.
229. Pussard, M., Pons, R., 1977. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica. 13, 557-610.
230. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R & da Silva AJ (2006). A multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri*. J Clin Microbiol 44: 3589–3595.
231. Raoult D and Boyer M (2010). Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. Intervirology. 53(5):321-9.
232. Raoult D and Boyer M (2010). Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. Intervirology. 53(5):321-9.
233. Recavarren-Arce S, Velarde C, Gotuzzo E, Cabrera J (1999). Amoeba angeitic lesions of the central nervous system in *Balamuthia mandrillaris* amoebiasis. Hum Pathol; 30: 269-73.
234. Rideout BA, Gardiner CH, Stalis IH, Zuba JR, Hadfield T & Visvesvara GS (1997). Fatal infections with *Balamuthia mandrillaris* (a free-living amoeba) in gorillas and other old world primates. Vet Pathol 34: 15–22.
235. Riestra-Castañeda JM, Riestra-Castañeda R, González-Garrido AA, Peña Moreno P, Martínez A J, Visvesvara G S, et al (1997). Granulomatous amebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* (Leptomyxiidae): report of four cases from Mexico. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 603-7.
236. Rivera F, Lares F, Ramirez E, Bonilla P, Rodriguez S, Labastida A et al (1991). Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in México city. Rev Infect Dis; 13: 388-389.
237. Rivera MA, Padhya TA (2002). *Acanthamoeba*: A rare primary cause of rhinosinusitis. Laryngoscope; 112:1201–3.
238. Ródio C, da Rocha Vianna D, Passos Kowalski K, Ferreira Panatieri L, von Poser G and Brittes Rott M (2008). In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii.* Parasitol Res 104:191–194
239. Rodriguez-Saragoza S, Ordaz C, Avila G, Muñoz JL, Arcienagas A and Romo de Vivar A (1999). In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Buddleira cordata* (Loganiaceae, H.B.K) on several strains of *Acanthamoeba*. J. Ethnopharmacol. 66:327-334.
240. Rowbotham TJ (1998). Isolation of Legionella pneumophila serogroup 1 from human feces with use of amebic cultures. Clin Infect Dis 26: 502–503.
241. Russell D, Sambrook J. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3ra. Edición. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
242. Salazar HC, Moura H and Ramos RT (1982). Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev. Saúde Pública*, vol.16, n.5, pp. 261-267.
243. Salomón C, Tonelli RL (2008). Capitulo 12: *Acanthamoeba* y otras Amebas patógenas de Vida Libre. En *Parasitosis Regionales*. Editorial EdiUNS. 2ra Ed. Bahía Blanca, Argentina

244. Sawyer TK, Griffin JL. (1971), *Acanthamoeba comandoni* and *A. astronyxis*: Taxonomic Characteristics of Mitotic Nuclei, "Centrosomes" and Cysts. The Journal of Protozoology, 18: 382–388. doi: 10.1111/j.1550-7408.1971.tb03339.x
245. Schaumberg D, Snow KK, and Dana MR. (1998). The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? Cornea 17:3–10
246. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA & Byers TJ (2001). Use of subgenus 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of Acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. J Clin Microbiol 39: 1903–1911.
247. Schuster F L (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev; 15, 342-354.
248. Schuster F L, Dunnebacke T H, Booton G C, Yagi S, Kohlmeier C K, Glaser C, Vugia D, Bakardjiev A, Azimi P, Maddux-González M, Martínez A J, Visvesvara G S (2003). Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. J Clin Microbiol; 41:3175-80.
249. Schuster FL &Visvesvara GS (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 34: 1001–1027.
250. Schuster FL, Dunnebacke TH, Booton GC, Yagi S, Kohlmeier CK, Glaser C, et al (2003). Environmental isolation of Balamuthia mandrillaris associated with a case of amebic encephalitis. J Clin Microbiol., 41:3175-80.
251. Schuster FL, Honarmand S, Visvesvara GV, Glaser CA (2006). Detection of antibodies against free-living amoebae *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* species in a population of patients with encephalitis.Clin Infect Dis. 42:1260–5.
252. Schuster FL, Visvesvara G (2004). Free-living amoebae as opportunistic and no-opportunistic pathogens of human and animals. International Journal of Parasitology 34:1-27.
253. Schuster FL, Visvesvara GS (2004). Opportunistic amoebae: challenges in prolylaxis and treatment. Drug Resist Updat., 7:41-51.
254. Schutzbank TE, Stern HJ. Principios y aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa. Acta Bioquim Clin Latinoam 1994; 18:277-287.
255. Seas RC, Bravo PF (2006). Amebic granulomatosis encephalitis due to Balamuthia mandrillaris: fatal disease increasingly recognized in Latin America. Rev Chilena Infectol., 23:197-9.
256. Seidel JS, Harmatz P, Visvesvara GS, Cohen A, Edwards J & Turner J (1982). Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. N Eng J Med 306: 346–348.
257. Shadrach WS, Rydzewski K, Laube U, Holland G, O¨ zel M, Kiderlen AF & Flieger A (2005). *Balamuthia mandriallaris*, free-living amoeba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for Legionella pneumophila bacteria. Appl Environ Microbiol 71: 2244–2249

258. Shakoor S, Beg MA, Mahmood SF, Bandea R, Sriram R, Noman F, et al (2011). Primary amoebic meningoencephalitis caused by Naegleria fowleri, Karachi, Pakistan. Emerg Infect Dis 17:258-61.
259. Sharma S, Srinivassan M, George C (1990). *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. Arch Ophthalmol; 108: 676-8
260. Shi WY, Gao H, Li SW, Wang FH, Xie LX (2004). Clinical study of the treatment of *Acanthamoeba* keratitis by penetrating keratoplasty. Zhonghua Yan Ke Za Zhi. ;40:750–4.
261. Shoff ME, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal DV (2008) Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. J Water Health 6:99–104
262. Siddiqui R, Khan NA (2008). Balamuthia amoebic encephalitis: an emerging disease with fatal consequences. Microb Pathog. 44:89-97.
263. Siddiqui R, Khan NA (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*., Parasit Vectors. 2012 5:6 Published online 2012 Jan 10. doi: 10.1186/1756-3305-5-6
264. Siddiqui R, Khan NA (2015). Balamuthia mandrillaris: Morphology, biology, and virulence. Trop Parasitol [serial online] 2015 [cited 2015 May 14]; 5:15-22. Available from: http://www.tropicalparasitology.org/text.asp?2015/5/1/15/149888
265. Sierra Calzado L (2011). Demostración del ameboflagelado *Naegleria fowleri* como agente etiológico de meningoencefalitis amébica primaria en Santiago de Cuba. http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol30_3_11/ibi03311.htm
266. Silva MA and Rosa JA (2003). Isolamento de amebas de vida libre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. Rev Saúde Pública; 37(2):242-6.
267. Simmons PA, Tomlinson A, Seal DV (1998). The role the Pseudomonas aeruginosa biofilm in the attachment of *Acantamoeba* to foyr types of hydrogel contact lens materials. Optom Vis Sci; 75 (12): 860-866.
268. Singh BN (1950). Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. Phil Trans R Soc Lond [Biol] 236: 405–461.
269. Singh BN (1950). Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. Phil Trans R Soc Lond [Biol] 236: 405–461.
270. Singhal T, Bajpai A, Kalra V, Kabra SK, Samantaray JC, Satpathy G, et al (2001). Successful treatment of*Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. Pediatr Infect Dis J. 20:623–7.
271. Smirnov AV, Brown S (2000). First isolation of a cyst-forming Vannella species, from soil – Vannella persistens n. sp. (Gymnamoebia, Vannellidae). Protistology 1 (3), 120-123
272. Smirnov AV, Brown S (2000). First isolation of a cyst-forming Vannella species, from
273. soil – Vannella persistens n. sp. (Gymnamoebia, Vannellidae). Protistology 1 (3), 120-123.

274. Starr, M. P. (1975). «A generalized scheme for classifying organismic associations». Symposia of the Society for Experimental Biology 29: 1–20.

275. Stehr-Green, J. K., T. M. Bailey, and G. S. Visvesvara (1989). The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. Am. J. Ophthalmol. 107:331–336.

276. Steinberg JP, Galindo RL, Kraus ES, Ghanem KG (2002). Review disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. Clin Infect Dis; 35:e43–9.

277. Stevens AR, Tyndall RL, Coutant CC and Willaert E (1977). Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artifically heated waters. Appl. Environ. Microbiol. vol. 34 no. 6701-705

278. Stothard DR, Hay J, Schroeder-Diedrich JM, Seal DV, and Byers TJ (1999). Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. J. Clin. Microbiol. 37:2687–2693.

279. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragosa S, Dean CL, Fuerst PA & Byers TJ (1998.) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. J Eukaryot Microbiol 45: 45–54.

280. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragosa S, et al (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. J Eukaryot Microbiol; 45: 45-54.

281. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragosa S, Dean CL, Fuerst PA & Byers TJ (1998.) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. J Eukaryot Microbiol 45: 45–54.

282. Suárez R, Espinoza Y, Villanueva C, Ramos J, Huapaya P and Marquina R (2002). Aislamiento de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* a partir de fuentes de agua en la ciudad de Ica. Anales de la Facultad de Medicina 63(2).

283. Symmers WSTC (1969). Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. Br Med J; 4: 449-54.

284. Taratuto A L, Monges J, Acefe J C, Meli F, Paredes A, Martínez A J (1991). Leptomyxid amoeba encephalitis: report of the first case in Argentina. Trans R Soc Trop Med Hyg; 85: 77.

285. Taylor PW (1997). Isolation and experimental infection of free-living amebae in freshwater fishes. J Parasitol, 63:232-7

286. Tomlinson A, Simmons PA, Seal DV, McFayden AK (2000). Salicylate inhibition of *Acanthamoeba* attachment to contact lenses: a model to reduce risk of infection. Ophthalmol. 107 (1): 112-117.

287. Topalkara A, Vural A, Polat Z, Toker MI; Arici MK, Ozan F and Cetin A (2007). In vitro amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellenii*. J Ocul Pharmacol Ther. 23: 40-45.
288. Torno MS Jr., Babapour R, Gurevitch A, and Witt MD (2000). Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. J. Am. Acad. Dermatol. 42:351–354.
289. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Müller N (2004). The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Research*, 92(5), 405-413.
290. Turner NA, Russell AD, Furr JR & Lloyd D (2000). Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba* castellanii. J Antimicrob Chem 46: 27–34.
291. Vaddavalli PK, Garg P, Sharma S, Sangwan VS, Rao GN, Thomas R (2011). Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *Acanthamoeba* keratitis. Ophthalmol, 118:29-35.
292. Vesaluoma M, Kalso S, Jokipii L, Warhurst D, Ponka A, Tervo T (1995). Microbiological quality in Finnish publicswimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? Br J Ophthalmol; 79: 178-181
293. Visvesvara G.S (1991). *Classification of Acanthamoeba*. RevInfect Dis. 13(suppl): S369-372.
294. Visvesvara GS & Maguire JH (2006). Pathogenic and opportunistic free-living amebas. Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. Tropical Infectious Diseases, Vol. 2 (Guerrant RL, Walker DH & Weller PF, eds), pp. 1114–1125. Churchill Livingstone.
295. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007). Pathogenic and opportunistuc freee-living amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri and Sappinia diploidea.* FEMS Inmunol Med Microbiol; 50: 1-26
296. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007). Pathogenic and opportunistuc freee-living amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri and Sappinia diploidea.* FEMS Inmunol Med Microbiol; 50: 1-26
297. Visvesvara GS, Roy S, Maguire JH (2011). Pathogenic and opportunistic free-living amebae: *Acanthamoeba* spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia pedata [Chapter 101]. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds. Tropical Infectious
298. Visvesvara GS, Schuster FL & Martinez AJ (1993) Balamuthia mandrillaris, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J Eukaryot Microbiol 40: 504–514.
299. Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez J (1993). *Balamuthia mandrillaris*, n. g., n. sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals*.* Journal of Eukaryotic Microbiology 40:504-514.
300. Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic fre-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*; and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50, 1-26.

301. Volkonsky M (1931). *Hartmanella castellanii* classification des hartmannelles. Arch Zool Exp Gen 72:317–339.
302. Volkonsky M (1931). *Hartmanella castellanii,* Classification des hartmannelles. Arch Zool Exp Gen 72:317–339.
303. Walochnik J, M¨uller K-D, Asp¨ock H & Michel R (2005). An endocytobiont harbouring *Naegleria* strain identified as *N. clarki* De Jonckheere, 1994. Acta Protozool 44: 301–310.
304. Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H (2000). Correlations between Morphological Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolated of *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol; 66 (10): 4408-4413.
305. Walochnik J, Wylezich C, Michel R (2009). The genus Sappinia: History, phylogeny and medical relevance. Experimental Parasitology
306. Walochnik J, Wylezich C, Michel R (2009). The genus Sappinia: History, phylogeny and medical relevance. Experimental Parasitology
307. Walochnik J, Wylezich C, Michel R. (2010) *Sappinia* sp.: History, phylogeny and medical relevance. *Exp. Parasitol.* 126: 4–13
308. Walochnik, J., et al (2009). The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. Exp. Parasitol. doi:10.1016/j.exppara.2009.11.017
309. Weekers, PH,. Bodelier PLE, Wijen JP, and Vogels GD (1993). Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii, Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59:2317–2319.
310. Weisman RA (1976). Differentiation in Acanthamoeba castellanii. Ann Rev Microbiol, 30:189-219.
311. Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE (1995). Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy. Cornea, 14:10-7.
312. Wylezich C, Walochnik J, Corsaro D, Michel R, Kudryavtsev A (2015). Electron Microscopical Investigations of a New Species of the Genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* sp. nov., Reveal a Dictyosome in this Genus. Acta Protozool. 54: 45–51
313. Wylezich C, Walochnik J, Michel R (2009). High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations. *Parasitol. Res.* **105:** 869–873
314. Zhang Y, Sun X, Wang Z, Li R, Luo S, Jin X, Deng S, Chen W. (2004). Identification of 18S Ribosomal DNA Genotype of *Acanthamoeba* from Patients with Keratitis in North China. *IOVS,* Vol. 45, No. 6