



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**IMPORTANCIA BIOMÉDICA DEL
GÉNERO Acanthamoeba.**

**Seminario de Titulación
TÓPICOS SELECTOS EN BIOLOGÍA**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

SHEILA SEGOVIA SILVA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNAM POR MANTENER SUS PUERTAS ABIERTAS A GENTE DE TODA CONDICION SOCIO-ECONOMICA Y CUYO ESCUDO SE MANTIENE FUERTE EN LOS CORAZONES DE LOS QUE HAN PASADO POR SUS AULAS.

Al Dr. **Sergio Cházaro Olvera**, por organizar el Seminario de Titulación, agradeciendo con el corazón el esfuerzo y el esmero en la preparación de los tópicos así como a su equipo de profesores que amablemente estuvo inyectándonos nuevamente esa energía que solo es posible absorber en un aula de clases. Por su Esfuerzo y Calidad Profesional Un Millón de Gracias.

A **María del Carmen Pérez Peña Zamora**, Muchísimas Gracias por el Aliento y el Ánimo que nos inyectó y a su Invaluable ayuda sin la cual no hubiera sido posible la culminación de este ciclo.

Con Mi Más Sincero y Profundo Agradecimiento Le Doy las Gracias **Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy** por su Asesoría, Ayuda y Apoyo en todo momento en la realización de esta tesina y por el Compromiso que Mantuvo conmigo hasta el final de este trabajo. Gracias Por Brindarme lo más valioso de Usted, Sus Conocimientos y Su Tiempo que en Verdad Valen Oro. Le Doy Las Gracias de todo Corazón por sus Consejos que me han Abierto los Ojos a cosas que en verdad son Sin Duda Verdaderamente Importantes.

“POR MI RAZA DE BRONCE HABLARÁ EL ESPÍRITU UNIVERSAL”

José Vasconcelos

DEDICATORIA

Mamá

Gracias Por ser un ejemplo para mí en todos los instantes de mi vida, ya que gracias a tu esfuerzo, sacrificio y constancia conseguí estudiar la carrera que siempre anhele. Gracias por tu eterno apoyo y en tu capacidad de creer en mí. Gracias por siempre estar a mi lado en todos los momentos y facetas de mi vida y aun cuando los momentos han sido difíciles Gracias por siempre quedarte a mi lado. Mi esfuerzo es tuyo porque tuyo es mi amor eterno. Te Amo Mamá.

Papá

Gracias por estar aquí, por nuestras platicas y por hacer a mí hermano feliz.

Hermano

Me siento orgullosa de ti, siempre lo he estado, Gracias por tu compañía y por la eterna competencia que sostenemos como un vínculo único que nos hace estar siempre unidos.

Dr. Marco Rodríguez

Por su confianza en Mí. Gracias por esos consejos que me han tirado de los ojos una venda y me han hecho ver la luz de lo que es realmente importante en la vida. **“Todo Pasa Por Una Razón”**. No Lo Olvidaré Nunca, Gracias.

Alejandra

Gracias por estar a mi lado incondicionalmente, apoyándome en todo momento tanto bueno como malo; por ofrecerme siempre sonrisas y tu buen humor y por ayudarme a recuperar la sonrisa perdida y a ver la vida con ese toque de humor con el que me haces ver que siempre tienes razón en cuanto a que es mejor sonreír ante la adversidad que echarse a llorar.

José Luis

Mi Amigo del Alma con el que he compartido tantas cosas, Gracias por tu Amistad y tu Apoyo, Te deseo todo el Éxito del Mundo el cual mereces.

Mis Compañeros de Seminario.

Les deseo un éxito aún mayor del cual ya son poseedores y que todos sus planes futuros tengan una realización triunfante al lado de sus seres Amados.

A la Vida Por Ser Una Maravillosa Incógnita.

“Cada cosa tiene un Ciclo, cada Ciclo una Historia y de la Historia nace una Enseñanza”

Desconocido

INDICE

Resumen	5
Introducción	5
Generalidades	5
<i>Acanthamoeba spp.</i>	7
Ecología	7
Antecedentes Históricos	8
Morfología	9
Ciclo de vida	10
Crecimiento <i>in vitro</i>	11
Epidemiología	12
Infecciones Sistémicas	14
Meningoencefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG)	14
Queratitis Amebiana	16
Terapia Antimicrobiana	17
Diagnostico Molecular	19
Referencias	21

IMPORTANCIA BIOMÉDICA DEL GÉNERO *Acanthamoeba*

RESUMEN

El conocimiento de que las amebas de vida libre son capaces de ocasionar enfermedades en humanos tiene alrededor de 50 años, antes del cual eran consideradas como organismos del suelo que eran inocuos o, cuando mucho, comensales en mamíferos. Las amebas del género *Acanthamoeba* son oportunistas y se presentan principalmente en huéspedes inmunocompetentes. Estos organismos tienen una distribución cosmopolita en suelo y agua, teniendo múltiples puntos de contacto con humanos y animales, como lo revelan los títulos de anticuerpos encontrados en las poblaciones humanas estudiadas. El número de infecciones ocasionadas es bajo, en comparación con otras parasitosis protozoarias (tripanosomiasis, toxoplasmosis, malaria, etc.), sin embargo la dificultad de diagnosticarla, el reto de encontrar tratamientos anti-microbianos óptimos; la morbilidad y alta mortandad asociadas, han sido causa de preocupación para médicos y parasitólogos. Esta revisión presenta la información acerca del género *Acanthamoeba*: su morfología y ciclo de vida, cultivo en laboratorio, ecología, epidemiología, naturaleza de la infección, y la terapias anti-microbiana adecuada y los procedimientos de diagnóstico molecular que han sido desarrollados para identificarla en el entorno y en los especímenes clínicos

INTRODUCCIÓN.

Generalidades

Las Amebas de vida libre (AVL) reúnen a más de 50 géneros amebianos, que en su gran mayoría son inofensivos al ser humano. Se les conoce también como gimnamebas que significa, “amebas desnudas”, término que se usa para diferenciarlas de las amebas testadas (Page, 1974). Las amebas de vida libre reciben esa denominación porque son anfitriónicas, es decir, capaces de vivir en el medio ambiente y actuar como parásitos en el ser humano. (Schuster et al., 2004). Existen 4 géneros de amebas de vida libre asociadas a enfermedad en humanos: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* (antes conocida como *Leptomyxid*) (Carter, 1972; Visvesvara et al., 1993). Y más recientemente *Sappinia diploidea* (Gelman et al., 2001). Estas pueden atacar al sistema nervioso central

produciendo dos tipos de lesión características: Infecciones oportunistas como Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) por *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*; e infecciones no oportunistas como Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) por *Naegleria* (Sungm et al., 2004). Además, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* producen lesiones oculares como queratitis y úlceras corneales, así como lesiones primarias en piel. (Schuster et al., 2004)

Se les localiza en todos los ambientes, terrestre, aéreo pero principalmente en el acuático, por lo que pueden ser encontradas en el mar, en pequeñas charcas (Martínez y Janitschke, 1985; Rivera *et al.*, 1987,1988 y 1994; Wellings *et.al.*, 1977); y en todo tipo de ambiente en aguas de estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, corrientes subterráneas e incluso agua de tuberías y envasada (Gallegos, 1997; Joklik, et al., 2000; Cabanes, *et al.*, 2001) en donde juegan un papel importante dentro del control poblacional de las bacterias, siendo estas su principal alimento; otras fuentes de alimentación para estos organismos son los hongos, levaduras y algas, entre otros (Pelczar et al., 1983; Wellings et al., 1979). El enquistamiento en la mayoría de las AVL les permite sobrevivir a las variaciones ambientales adversas, así como permanecer viables en sequías, cambios de pH, falta casi total de oxígeno y escasez de alimento además, les permite el desplazamiento a través de corrientes de aire, en cuyo caso su dispersión depende del fenómeno que lo provoque (vientos principalmente) y del tamaño del quiste de la ameba, aquellos organismos que tengan medidas menores de 20 μm , podrán permanecer en el aire por más tiempo y tendrán mayor dispersión. La mayoría de las especies de amebas tienen tamaños en el intervalo de 6 a 15 μm de aquí que su distribución sea cosmopolita. (Rivera et al., 1979;1987;1998; 1994)

En los ambientes acuáticos, las AVL viven sobre la superficie del agua o adheridas a partículas flotantes, también se les encuentra en el sedimento si el cuerpo de agua no es muy profundo (Rodríguez, 1994). En el ambiente edáfico estas amebas participan en el incremento de la tasa de transformación del fósforo a formas aprovechables para las plantas (Fenchel, 1987;Tyndall et al., 1989)

Las enfermedades causadas por amebas de vida libre en humanos han sido reconocidas por más de 35 años, cuando Malcolm Fowler y Rodney F. Carter reportaron los primeros

cuatro casos humanos de meningoencefalitis producidas por estos microorganismos (Fowler y Carter; 1965).

Acanthamoeba spp.

Ecología

Esta es la amiba más común que se encuentra en muestras de agua y de suelo, existe en la naturaleza como amiba trófica o como quiste latente (Page, 1988). Como trofozoíto, *Acanthamoeba* se alimenta de ciertas bacterias cuando vive en el medio ambiente, tanto así que se le involucra un papel como acarreador de algunas de ellas (proceso denominado endosimbiosis). Entre las más importantes tenemos a *Legionella spp.* involucrada en neumonías adquiridas en la comunidad y en neumonías nosocomiales; también está asociada a neumonías atípicas, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. *In vitro* se ha demostrado que *Acanthamoeba* puede transportar a las siguientes bacterias: *Afilia felis*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli O157*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Simkania negevensis* y *Vibrio cholera*. (Schuster y Visvesvara, 2004)

Tiene una distribución cosmopolita y ha sido aislada en una amplia variedad de hábitats, incluyendo aguas dulces, salobres y marinas, arena de playas, drenajes y suelos, que van desde las regiones tropicales hasta las árticas. Se ha aislado de la tierra de las macetas, los acuarios y humidificadores domésticos, llaves de agua y drenajes de fregaderos; en los entornos hospitalarios se ha recuperado de los cabezales de las regaderas, ventiladores, baños de hidroterapia y de las unidades de calefacción, ventilación y aire acondicionado. Los sistemas de irrigación dental también han permitido hacer aislamientos. Las amibas han aparecido como contaminantes en los cultivos de tejido, probablemente como quistes transportados por el aire, donde han sido confundidos con células transformadas o citopatogías ocasionadas por infecciones virales. En el laboratorio han sido aisladas de las estaciones de lavado de ojos de emergencia, donde representan un peligro para las personas con lesiones en la cornea. Su amplia distribución pone a los seres humanos en contacto con estas amibas en el suelo o el agua, y se ha encontrado evidencia en la presencia de anticuerpos contra *Acanthamoeba* en diversas poblaciones humanas y animales. (Frederick et al. 2004)

Antecedentes Históricos.

El primer reporte que indica que el género *Acanthamoeba* podría causar enfermedad en el hombre data de 1958 y correspondió a una prueba de calidad de la vacuna contra la poliomielitis en cultivos celulares, en la que aparecieron placas que se pensó, inicialmente, podrían haber sido inducidas por el virus polio, porque ratones y monos, posterior a la inoculación con fluidos provenientes de los cultivos, murieron a causa de una meningoencefalitis. Sin embargo, se encontró que las placas habían sido causadas por amebas cuyos trofozoítos y quistes fueron identificados como pertenecientes al género *Acanthamoeba*. La observación realizada por Culbertson y cols, de los animales muertos, permitió presumir su rol como patógeno para el hombre. *Acanthamoeba* fue descrita primero por Castellani, cuando reportó la presencia de una ameba en cultivos de *Cryptococcus pararoseus*. El género fue establecido, posteriormente, por Volkonsky en 1931. (Jeric, 2007)

La primera infección humana por *Acanthamoeba* fue descrita por Jager y Stamm en 1972. Por otro lado Martínez en 1980 caracterizó las infecciones oportunistas, reconoció su ocurrencia en pacientes debilitados o enfermos crónicos, y fue también quien distinguió entre las patologías ocasionadas por *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Los casos de queratitis ocasionados por *Acanthamoeba* fueron diagnosticados en el Reino Unido y en los Estados Unidos por Naginton et al. en 1974 y Jones et al. en 1975, respectivamente. (Frederick et al. 2004)

En Perú, en 1979, Arce y Asato demuestran un caso de encefalitis por *Acanthamoeba*. En 1996, Narváez encontró 4 casos de encefalitis amibiana por *Acanthamoeba* (Narváez, 1996)

En el Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM, hasta 1996, se reportó 10 casos de acanthamoebiasis aisladas de úlceras cutáneas. Posteriormente, en el año 2000, reportó un caso de acanthamoebiasis cutánea (Navarro et al., 2000)

En el 2005 Galarza et al. Reporta cuatro casos de lesiones cutáneas en 3 pacientes inmunocomprometido y un inmunocompetente. (Galarza et al, 2005)

El número de casos reportados por *Acanthamoeba* a nivel mundial se estima en aproximadamente en 200 casos para infección sistémica y más de 3000 casos reportados para queratitis amebiana (Schuster et al., 2004)

Morfología

Morfológicamente, *Acanthamoeba* spp., puede pertenecer tres grupos (I, II y III), que se distinguen entre sí por diferencias en su morfología del quiste (Pussar and Pons, 1977). El Grupo I tiene quistes grandes (18 μm o más), con endocistos en forma de estrella y ectocistos lisos o arrugados. El Grupo II tiene quistes más pequeños (< 18 μm) con endocistos poliédricos, globulares, ovoides o en forma de estrella, y ectocistos ondulados; y el Grupo III tiene quistes (< 19 μm) con endocistos globulares u ovoidales, y ectocistos lisos u ondulados. (Frederick et al. 2004)

El trofozoíto de *Acanthamoeba* es más grande que el de *Naegleria* (entre 24 y 56 μm), se caracteriza por presentar pseudópodos finos llamados acantópodos. Se divide por fisión binaria por medio de una mitosis típica. El quiste es ornamentado, mide entre 11 y 25.3 μm de diámetro, presenta una pared doble y poros en la unión del ectoquiste y el endoquiste. (Rondanelli, 1987; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997) El núcleo vesicular contiene un gran nucleolo central. En su estadio quístico, *Acanthamoeba* se encuentra protegida del medio ambiente pudiendo sobrevivir hasta 20 años (Mazur et al., 1995). El quiste tiene 2 paredes compuestas por celulosa: el endoquiste y el ectoquiste. La pared posee poros los cuales permiten a la ameba emerger de su estadio quístico al estadio de trofozoíto. **Fig 1** (Schuster et al., 2004)

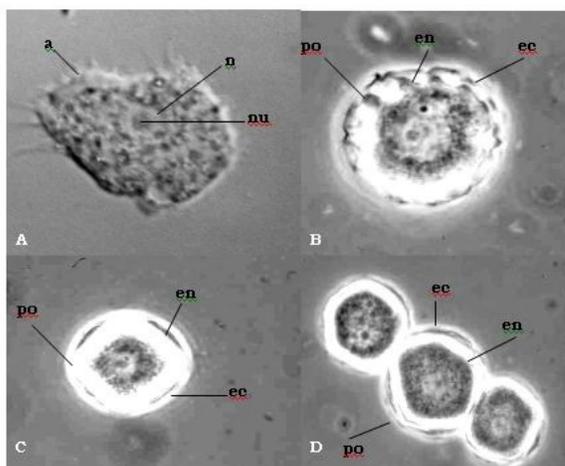


Figura 1. *Acanthamoeba*: A) trofozoíto con acantópodos. Contraste diferencial de interferencia; B) quiste con endoquiste estrellado; C) quiste con endoquiste poligonal y D) quiste con endoquiste semicircular. Contraste de fases. 400 \times . a: acantópodos; n: núcleo; nu: nucleolo; pa: pared; po: poro; ec: ectoquiste; en: endoquiste

Ciclo de vida.

El ciclo biológico de este parásito presentados estadios: trofozoíto y quiste, siendo el primero, la forma vegetativa, es decir, de alimentación activa y reproducción; y el segundo, la forma quística, de resistencia frente a condiciones ambientales adversas. En los diversos hábitats donde se han encontrado, desarrollan su ciclo biológico multiplicándose por división binaria. **Fig. 2**

Sobreviven en el medio ambiente, especialmente, en medio acuático a temperaturas variables entre 25 y 35°C a Ph ligeramente neutro. Los aislamientos clínicos pueden crecer a 37°C; algunos, particularmente aquellos provenientes de infecciones corneales, crecen óptimamente a temperaturas menores a las del cuerpo humano (30 °C) (Schuster et al., 2004)

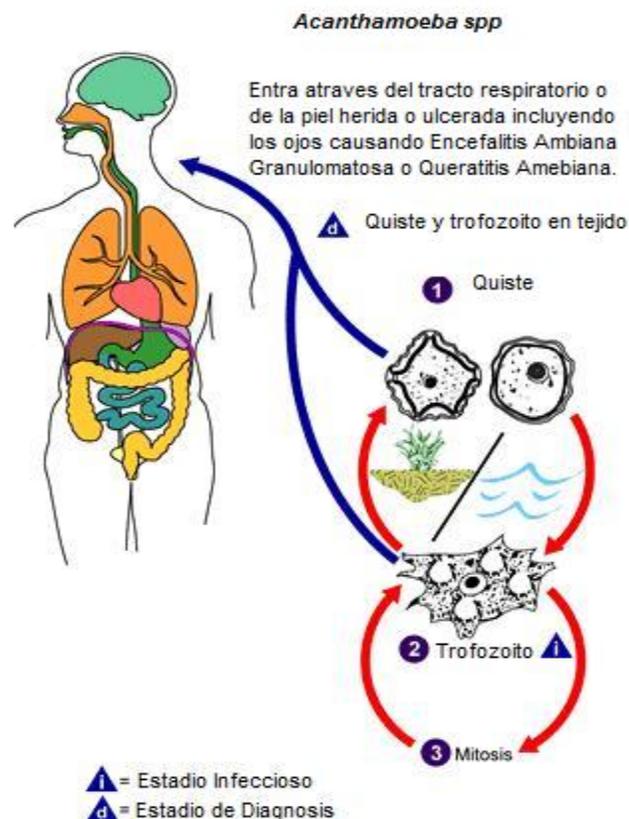


Fig. 2 Ciclo de Vida de *Acanthamoeba spp.*

Crecimiento *in vitro*

En la actualidad, es parte de la familia *Acanthamoebidae* y la identificación de género es relativamente fácil y se realiza utilizando criterios morfológicos. Para la diferenciación de especies se han aplicado criterios inmunológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares, ya que los morfológicos resultan subjetivos y se ven alterados por las condiciones de cultivo. Algunos laboratorios han empleado para esta diferenciación análisis de fragmentos de restricción RFLP (Polimorfismo en el largo de fragmentos de restricción) para estudiar los *clusters* de cepas de *Acanthamoeba*. Incluso, se ha logrado la secuenciación completa del gen de la subunidad menor ribosomal del núcleo. Usando este criterio, Stothard y cols designaron 12 tipos de secuencias (genotipos) de T1 a T12. De este análisis se ha podido establecer, por ejemplo, que la mayoría de las cepas aisladas en cuadros de queratitis corresponderían al genotipo 4. (Jeric, 2007)

Tanto los aislados ambientales como los clínicos pueden ser establecidos *in vitro* utilizando un agar no nutritivo y una fuente alimenticia bacteriana adecuada, por ejemplo, **Escherichia coli** o **Enterobacter aerogenes** (Schuster, 2002). El cultivo de especímenes clínicos donde se sospecha infección amebiana (tejidos a los que se les realizaron biopsias, raspados de córnea), es importante para confirmar que las amibas son los agentes causales de la infección, para la identificación del patógeno y para probar la sensibilidad anti-microbiana. La mayoría de los aislados se adaptan fácilmente para crecer en el medio axénico (libre de bacterias), que sigue a un tratamiento con antibióticos, aunque algunos aislados clínicos pueden tener fastidiosas necesidades de crecimiento y requerir suplementos nutritivos, tales como sueros y vitaminas adicionales (Schuster, 2002). Las formulaciones para medios definidos están disponibles para stocks patógenos y para no patógenos (Schuster, 2002). Todos los aislados crecen bien a temperatura ambiente (~25°C); los aislados clínicos pueden crecer a $\geq 37^\circ\text{C}$. Algunos aislados clínicos, particularmente aquellos de infecciones de córnea, tienen un crecimiento óptimo a una temperatura inferior a la temperatura corporal de los mamíferos (-30 °C) (Schuster and Visvesvara, 1998).

Epidemiología

Considerando las muchas oportunidades de contacto con amibas, es sorprendente que se encuentran relativamente pocas infecciones de *Acanthamoeba* en humanos y animales. Pocas especies han sido asociadas con infecciones humanas: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi* y *A. polyphaga*. (Frederick et al. 2004) Como consecuencia de su distribución cosmopolita el contacto con el ser humano es constante y probablemente es la razón de la presencia de anticuerpos de *Acanthamoeba* en suero humano. (Bottone, 1993). A pesar de las oportunidades de infección, la acantamoebiasis en las poblaciones son raras y con excepción de la queratitis amebiana, esta principalmente limitada a huéspedes inmuno-comprometidos. El desarrollo de la acantamoebiasis sistémica es lento, con un curso subclínico tendencioso desde el momento de la infección.

La queratitis por *Acanthamoeba* es una enfermedad más aguda, con rápido ataque después de la infección. El portal de entrada puede ser a través de lesiones en la piel que son contaminadas por el suelo, o a través del tracto respiratorio superior por los quistes que son transportados por corrientes de aire o por el viento. Una vez en el cuerpo, las amibas pueden dispersar hematógenuos al sistema nervioso central (SNC) y a diversos órganos. Los tipos de infecciones producidas incluyen encefalitis amebiana granulomatosa; e infecciones nasofaríngeas, cutáneas y diseminadas. (Frederick et al. 2004).

Además de las infecciones sistémicas, *Acanthamoeba* ocasiona Queratitis Amebiana cuando la amiba ataca directamente la superficie de la cornea. (Jones et al., 1975). Para el usuario de los lentes de contacto, una fuente importante de la infección ha sido la presencia de amibas en el agua de la llave, que no es estéril, y que se utiliza para preparar soluciones salinas para el cuidado de los lentes. Una caja de lentes con limpieza poco frecuente, puede desarrollar biopelículas bacterianas, que constituyen una fuente de alimento para las amibas. Las soluciones oftálmicas, si contienen amibas, también podrían contener bacterias que, en sinergia con las amibas, pueden promover las lesiones corneas a través de sus secreciones y residuos metabólicos (Bottone et al., 1992). Se ha obtenido la “huella digital” de las amibas infecciosas a través de la digestión con endonucleasa de todo el DNA celular, o secuenciando el rRNA18S, y rastreándolo de regreso hasta la fuente de abastecimiento de agua potable en el hogar de la persona que

usa los lentes de contacto y/o la caja de los lentes (Kilvington et al., 1991; Ledee et al., 1996). Usar lentes de contacto cuando se nada en albercas o se toman baños en tinas calientes, que podrían albergar fauna bacteriana y amebiana, es una actividad de alto riesgo. Un caso de queratitis ha sido rastreado hasta una tina caliente al aire libre en un jardín (Frederick et al. 2004). Las temperaturas elevadas del agua, como las que se encuentran en las tinas calientes, constituyen un entorno selectivo para las cepas de amibas que pueden tolerar la temperatura corporal de los mamíferos. Se encontró que los tinacos de almacenamiento de agua en las azoteas de las casas de 27 pacientes de Queratitis Amebiana en el Reino Unido fueron la fuente de las amibas de vida libre en 89%, y de *Acanthamoeba* en 30% del agua de las llaves de los hogares donde se hicieron pruebas (Frederick et al. 2004). Se especuló que el uso de tinacos como fuente de abastecimiento de agua en los hogares fue la causa de la elevada incidencia de Queratitis Amebiana en este país (17-21 casos por millón) — 15 veces más alta que la incidencia de Queratitis Amebiana en Estados Unidos (uno o dos casos por millón).

Los datos obtenidos en los años 80 indican que los hombres son más propensos a desarrollar queratitis como resultado del trauma, mientras que las infecciones en mujeres surgieron principalmente del uso de lentes de contacto (Stehr-Green et al., 1989).

Una tosca aproximación al número de casos de Queratitis Amebiana a escala mundial en el 2004 es >3000. Una revisión de los casos de esta enfermedad de 1985 a 1987 estimó que la incidencia anual de infecciones es de uno o dos por millón de usuarios de lentes de contacto (Frederick et al. 2004).

Los aislados de *Acanthamoeba* varían en su virulencia (y sensibilidad anti-microbiana), que pueden evaluarse utilizando ratones o cultivos de tejidos (De Jonckheere, 1980; Frederick et al. 2004; Mazur et al., 1995). Los estudios que utilizaron al ratón como modelo para la encefalitis han aportado información acerca del curso de la enfermedad, la variación en la virulencia observada entre los aislados de *Acanthamoeba*, y la pérdida de la virulencia como resultado de un cultivo *in vitro* prolongado (Mazur et al., 1995). El modelo también es útil para *Naegleria*, *Balamuthia*, y otras amibas patógenas (Frederick et al. 2004). Los ratones que son inoculados con suspensiones de *Acanthamoeba* de manera intranasal o intracraneal, desarrollan síntomas similares a los de los humanos con encefalitis amebiana, generalmente en días o semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia de la cepa amebiana (Culbertson et al., 1958).

La virulencia puede medirse por el tiempo transcurrido antes de la aparición de los síntomas y la muerte, el número de animales muertos y las dosis de amibas requeridos para producir la encefalitis. La capacidad de la amiba para ocasionar una citopatología en los cultivos de tejido también ha sido utilizada como indicador de la virulencia (Cursons and Brown, 1978; De Jonckheere, 1980; Niszl et al., 1998).

Infecciones Sistémicas

Meningoencefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG)

Generalmente es asociado con los individuos que ya tienen enfermedades subyacentes como, lupus eritematoso sistémico, diabetes, insuficiencia renal, cirrosis, tuberculosis, úlceras de la piel, el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) la enfermedad de Hodgkin. La predisposición de factores incluye el alcoholismo, el consumo de drogas, el tratamiento de esteroide, la quimioterapia de cáncer, la radioterapia, y el trasplante de órganos. Los casos de EAG causados por *Acanthamoeba* han sido encontrados en niños inmunocompetentes y adultos. Los síntomas son dolor de cabeza, confusión, náusea, vómitos, fiebre, letargo, tortícolis, déficits focales neurológicos, signos de presión intracraneal aumentada. (Marciano-Cabral, 2003)

Las amibas atacan el tejido cerebral, produciendo lesiones necrotizantes hemorrágicas, más comúnmente encontradas en el cerebro, cerebelo y tallo cerebral **Fig 3** (Martinez, 1985). En secciones de cerebro teñidas con Hematoxilina-Eosina (H y E), es posible ver grandes números de amibas en los espacios perivasculares, que pueden ser diferenciadas de las células huésped por su morfología nuclear característica. Los quistes de paredes gruesas pueden verse en las secciones de tejido. Debido a que la enfermedad tiene un curso crónico con un largo periodo de incubación, es difícil identificar una fuente focal de la infección. Los sistemas más comunes incluyen anormalidades conductuales, fiebre, dolor de cabeza y hemiparesis. (Martinez, 1985).

El diagnóstico pre-mortem, si acaso se realiza, generalmente sigue a una biopsia del tejido cerebral y tinción con inmunofluorescencia indirecta para *Acanthamoeba* en las secciones de tejido (Frederick et al., 2004). Las imágenes con resonancia magnética y barridos con tomografía computarizada, son útiles para reconocer y definir la localización de las lesiones que ocupan espacio. Debido a la falta de familiaridad con las amibas en secciones teñidas con H y E, éstas pueden ser fácilmente pasadas por alto en los exámenes histopatológicos rutinarios de las secciones de tejido, en general, las amibas no se encuentran en CSF. Las amibas también pueden verse en el tejido de las biopsias de lesiones cutáneas y nasofaríngeas con tinción H y E convencional o inmunofluorescencia.

En algunas condiciones, *Acanthamoeba* puede invadir por vía oral. Las amibas han sido identificadas en tejidos de una biopsia de pared estomacal ulcerada de una mujer que murió debido a la perforación de la úlcera. Se supuso que las amibas habían invadido de manera secundaria el recubrimiento gástrico alterado, probablemente debido a las alteraciones en la acidez gástrica. Se han infectado ratones con *Acanthamoeba* inoculada por vía oral, particularmente después de la aplicación de dosis de cimetidina para reducir la acidez estomacal, o de tetraciclina para modificar la flora bacteriana intestinal (Frederick et al., 2004) Las Infecciones se esparcen al SNC.

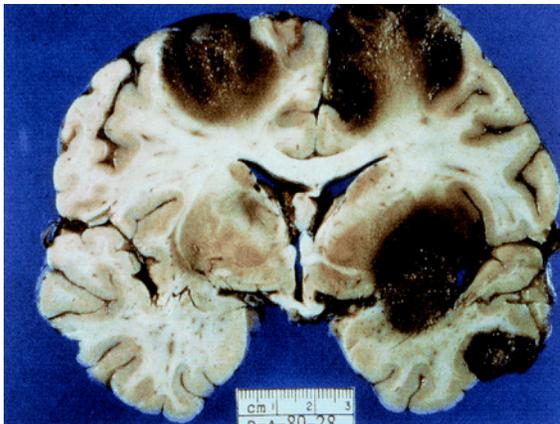


Fig 3. Sección de guirnalda de los hemisferios cerebrales con necrosis cortical y subcortical de un caso fatal de EAG humano.

Queratitis Amebiana.

Varias especies de *Acanthamoeba*, incluyendo *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. quina*, y *A. lugdunensis*, causan Queratitis Amebiana. (Marciano-Cabral, 2003). La enfermedad es resultado del trauma córneo o, más frecuentemente, de los errores en el uso y cuidado de los lentes de contacto, y en el mantenimiento de la caja de los lentes. El trauma córneo proveniente del daño físico a la cornea, directa o indirectamente introduce amibas en la superficie de la cornea y el estroma subyacente (Jones et al., 1975). Los primeros síntomas de la Queratitis Amebiana incluyen dolor, lagrimeo, fotofobia que, a diferencia del curso subclínico temprano de las infecciones sistémicas tienen un efecto inmediato en el bienestar del paciente. El diagnóstico clínico de las primeras etapas de la Queratitis Amebiana se basa en la presencia de un patrón epitelial dendritiforme. Con el tiempo se desarrolla un infiltrado estrómico en forma de anillo, ocasionado por los leucocitos polimorfonucleares que se dirigen al área afectada. **Fig. 4** La tinción de los raspados de cornea con colorante fluorescente blanco de calcoflúor se ha utilizado ampliamente para ver a las amibas a escala microscópica (Wilhelmus et al., 1986). Las amibas pueden cultivarse a partir de raspados córneos. Una vez atrincheradas en el estroma córneo, las amibas son difíciles de erradicar. Las amibas tróficas son más sensibles a los anti-microbianos utilizados para tratar Queratitis Amebiana que los quistes (Turner et al., 2000). Mientras el tratamiento anti-microbiano puede destruir a las amibas tróficas, los quistes latentes pueden originar amibas una vez que el nivel de droga se reduce. También se ha reportado que el tratamiento con drogas induce al enquistamiento de las amibas en el estroma (Kilvington et al., 1990). La recurrencia de la infección no es rara. Se ha empleado el implante córneo (queratoplastia penetrante), como medio para mejorar la visión y/o reducir la carga amebiana en la cornea. Con frecuencia, sin embargo, se realizan queratoplastias repetitivas debido a una explosión de la infección debido a los quistes sobrevivientes en el área que rodea el implante. El tratamiento, cuando menos en las etapas iniciales, es intenso, con aplicaciones horarias tópicas de la droga, durante tres o cuatro meses (Frederick et al., 2004).

La aplicación tópica de esteroides es común en el tratamiento de la Queratitis Amebiana, porque alivian el dolor y reducen la inflamación, particularmente después de

la queratoplastia. Con base en los estudios *in vitro* y el uso del modelo del hámster chino para Queratitis Amebiana, se encontró que el uso de esteroides (dexametasona), estimula la proliferación de amibas tróficas, y fortaleció el efecto citopático de las amibas en células epiteliales de la cornea en cultivo (Frederick et al., 2004). Los esteroides también son responsables de suprimir la respuesta inmune del huésped, permitiendo una mayor dispersión de las amibas en el estroma córneo (Berger et al., 1990). Se encontró que la dexametasona estimula la exquistación de *Acanthamoeba in vitro*, pero no la enquistación (Frederick et al., 2004) Esto puede llevar a un incremento en la carga amebiana en la cornea, con el resultante aumento de la inflamación y el daño corneo, pero también ayuda a mantener a los organismos en su etapa trófica, que es más sensible a los anti-microbianos. Entonces, los esteroides pueden ser útiles cuando se utilizan junto con agentes amebicidas y quisticidas efectivos.

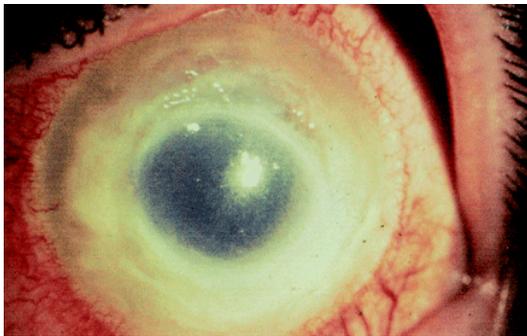


Fig. 4. infiltrado estrómico en Queratitis Amebiana.

Terapia Antimicrobiana.

No hay una droga individual que sea efectiva contra la acantamibiasis sistémica. Un gran número de anti-microbianos han mostrado ser eficaces contra las amibas *in vitro*, pero no hay garantía de que las mismas drogas serán efectivas a nivel clínico. Con frecuencia, las mismas drogas que han favorecido la curación de un paciente, también han sido utilizadas sin éxito en el tratamiento de otros casos de acantamibiasis. El resultado de una infección es afectado por el hecho de qué tan temprano se ha iniciado el tratamiento con drogas, la dosis infecciosa de amibas, la virulencia, y la sensibilidad anti-microbiana de una cepa particular de amibas. El estatus de la inmunidad del huésped también es importante, especialmente en el caso de individuos immuno-

comprometidos, que han sido debilitados por múltiples infecciones oportunistas, tales como la neumonía neumocística y la candidiasis, entre otras. Las drogas que han sido utilizadas clínicamente incluyen anfotericina B, azitromicina, fluconazol, 5-fluorocitosina (flucitosina), isetionato de pentamidina, y sulfadiazina (Frederick et al., 2004) Las drogas han sido utilizadas en combinación, por lo que puede haber efectos sinérgicos que no son aparentes *in vitro*. El prospecto de un tratamiento exitoso para la EAG es pobre. En los casos en que ha sido posible aislar la amiba del cerebro u otros tejidos, pre o post-mortem, las pruebas de las drogas han mostrado diferencias en la sensibilidad a éstas entre las especies, e incluso entre las cepas de la misma especie. Entonces, en no pocas ocasiones, las amibas de diferentes laboratorios dan resultados contradictorios en las pruebas de sensibilidad anti-microbiana. Para un máximo aseguramiento de la eficacia, es necesario determinar la susceptibilidad al anti-microbiano de los aislados individuales. El prospecto para el tratamiento exitoso de la Queratitis Amebiana es esperanzador. Se ha probado un gran número de drogas con diversos grados de eficacia, permitiendo algunas recuperaciones, pero también algunos fracasos. Se ha encontrado resistencia anti-microbiana. Una consideración importante en las infecciones corneas es el uso de drogas que no sólo son amebicidas, sino también quisticidas. Mientras los quistes sean viables, la infección puede recurrir. Algunas de las primeras drogas que se utilizaron en el tratamiento de la Queratitis Amebiana, incluyen el isetionato de propamidina, la hexamidina neomicina, neosporina y los azoles (itraconazol, ketoconazol).

Los biguanidos, que son una clase de desinfectantes catiónicos son las adiciones más recientes a la farmacopea de la queratitis, y han mejorado sustancialmente las probabilidades de recuperación. El gluconato de clorhexidina, que es un compuesto ampliamente utilizado como ingrediente de los jabones desinfectantes, y la polihexametil biguanida, que se utiliza como limpiador de albercas, son dos compuestos que han mostrado excelentes propiedades amebicidas y quisticidas *in vitro* y cuando se utilizan de manera tópica en el tratamiento de la Queratitis Amebiana. Las drogas se usan solas o, con mayor frecuencia, junto con la propamidina o hexamidina. Algunas variedades de *Acanthamoeba* han mostrado resistencia a los biguanidos, lo que ha activado la búsqueda de otras drogas efectivas. Entre éstas está la hexadecilfosfocolina (miltefosina) la amidoamina miristamidopropil, y las magaininas dimetilamina (Frederick et al., 2004).

Diagnostico Molecular.

El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular para la acantamibiasis surgió a partir de los estudios de filogenia y taxonomía de *Acanthamoeba*, a través del análisis de ADN nuclear y/o mitocondrial. Gran parte de las investigaciones se hicieron con aislados de Queratitis Amebiana, ya para caracterizar el agente etiológico, para rastrear la fuente de la infección en el entorno del paciente, o para estudiar muestras ambientales de cepas potencialmente patógenas. La Queratitis Amebiana es más común que las infecciones sistémicas, y las amibas pueden aislarse con más facilidad sin tener que recurrir a procedimientos invasivos, tales como las biopsias. El aislamiento, cultivo y posterior identificación de las amibas a partir de raspados de la cornea sigue siendo el patrón oro de la diagnosis. El cultivo, sin embargo, puede ser un proceso lento, y puede presentar dificultades debido a que puede haber demasiado pocas amibas en la muestra clínica para iniciar un cultivo, o a la inhibición del crecimiento amebiano debido al uso previo de agentes anti-microbianos, a que las amibas se embeben en el estroma de la cornea – en forma tal que ya no son alcanzadas por el raspado – o a una cepa infecciosa que no se adapta fácilmente al crecimiento *in vitro*. Las técnicas moleculares para la identificación de *Acanthamoeba*, así como otras amibas patógenas son más rápidas que el cultivo, tienen mayor sensibilidad y pueden hacerse con una pequeña cantidad de muestra. La identificación de las amibas infecciosas a través de la metodología molecular generalmente tiene un buen acuerdo, aunque no perfecto con los resultados obtenidos a partir del cultivo de los raspados de la cornea; *Acanthamoeba* puede ser cultivada a partir del epitelio corneo, pero no puede ser detectado con el filtrado molecular para ADN, o viceversa.

Las técnicas que se han desarrollado incluyen (i) PCR para amplificar el AND de la pequeña sub-unidad nuclear 18S y los genes rDNA 16S mitocondriales, (ii) análisis de reacción en cadena de la polimerasa y de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de rRNA nuclear o mitocondrial y (iii) sondas fluorescentes para hibridizar con el ADN de *Acanthamoeba* DNA.

La PCR ha sido ampliamente utilizada como medio para incrementar el conocimiento de la filogenia de los miembros del género *Acanthamoeba* (Stothard et al., 1998, 1999), y

para identificar amibas en cultivo (Khan et al., 2001). Pero lo que es más importante, la metodología tiene relevancia clínica para detectar a *Acanthamoeba* en raspados de cornea, y para diferenciar la Queratitis Amebiana de las queratitis fúngicas y virales, permitiendo el inicio temprano de un tratamiento anti-microbiano efectivo (Lehmann et al., 1998). Utilizando la amplificación del rRNA rRNA 18S, se ha detectado ADN de *Acanthamoeba* en muestras de epitelio córneo y lágrimas de usuarios de lentes de contacto que desarrollaron Queratitis Amebiana (Lehmann et al., 1998). También se ha encontrado que el uso de los genes del rRNA 18s es efectivo como auxiliar diagnóstico en casos de Queratitis Amebiana ocasionada por trauma, y no por el uso de lentes (Pasricha et al., 2003). Los análisis basados en PCR fueron lo suficientemente sensibles como para detectar <5 amibas tróficas en las muestras (Lehmann et al., 1998; Khan et al., 2001; Schroeder et al., 2001).

Se han diseñado sondas con oligonucleótidos fluorescentes específicas para género (*Acanthamoeba*) y sub-género (secuencia tipo T4) complementarias para los genes del rRNA 18s para la hibridación *in situ* (Stothard et al., 1999). Las sondas se utilizaron con éxito en células completas de cultivos axénicos, raspados de cornea o material seccionado desparafinizado y, en un grado limitado, pudieron diferenciar entre las amibas tróficas y los quistes. Las sondas fueron útiles para descartar amibas distintas a *Acanthamoeba* en las muestras, dado que no hibridaron con el AND de las amibas *Hartmannella* o *Balamuthia*. Otro estudio identificó a *Acanthamoeba* spp. de raspados de cornea y lodos de drenaje en Escocia y Sudáfrica, utilizando productos de amplificación específicos para género y genotipo (Schroeder et al., 2001).

El clado T4 de *Acanthamoeba* spp., contiene a la mayoría de los patógenos de queratitis, y también es el más abundante en el medio ambiente de entre los 15 clados reconocidos. Las amibas T4 tienen una distribución universal, son los agentes de la AK en todo el mundo, e integran la mayoría de los aislados de *Acanthamoeba* de las playas arenosas del sur de la Florida (Frederick et al., 2004). La capacidad de las amibas para sobrevivir en un entorno de playa, con exposición al agua de mar, puede habilitarlas para invadir y colonizar la superficie de la cornea, donde la composición de las lágrimas es similar a la del agua de mar diluida. Las amibas T4 también fueron aisladas de peces dulceacuícolas asintomáticos (Dykova et al., 1999), y de una lesión necrótica en un lacertilio iguánido (Walochnik et al., 1999).

Referencias

- Berger, S. T., B. J. Mondino, R. H. Hoft, P. B. Donzis, G. N. Holland, M. K. Farley, and J. E. Levenson.** 1990. Successful medical management of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* **110**:395-403.
- Bottone, E. J.** (1993), Free-Living Amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: An Overview and Basic Microbiologic Correlates, Mount Sinai J. Med., **60**: 260-270.
- Cabanes P, Wallet F, Pringuez E, Pernin P.** Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *N. fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 2001;**67**(7):2927-31.
- Carlos Galarza, Ericson Gutiérrez, Martha Uribe, Willy Ramos, Alex Ortega, Jack Ávila, Jorge Hanco, Yrma Espinoza, Manuel Espinoza, Marco Navimcopa, Deny Gámez.** Amebas de vida libre en lesiones cutáneas Reporte de 4 casos, *Dermatol Peru* **2006;16**(1):36-40.
- Carter RF.** Primary Amoebic Meningo-Encephalitis. An Appraisal of Present Knowledge. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1972; **66**: 193-213
- Cerva, L.** 1989. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **33**:99-103.
- Culbertson, C. G., J. W. Smith, and H. Minner.** 1958. *Acanthamoebae*: observations on animal pathogenicity. *Science* **127**:1506.
- Cursons, R. T., T. J. Brown, and E. A. Keys.** 1978. Virulence of pathogenic free-living amebae. *J. Parasitol.* **64**:744-745.
- De Jonckheere, J. F.** 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:681-685.
- Dykova, I., J. Lom, J. M. Schroeder-Diedrich, G. C. Booton, and T. J. Byers.** 1999. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J. Parasitol.* **85**:1106-1113.
- Fenchel, T.** 1987. *Ecology of protozoa: the Biology of free-living Phagotrophic Protists.* Springer Verlag, Wisconsin. 197 pp.
- Ferrante, A.** 1991. Immunity to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* **13**(Suppl. 5):S403-S409.
- Fowler M, Carter RF.** Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp.: APreliminary Report. *Br Med J* 1965; **2**: 740-743
- Horn, M., T. R. Fritsche, R. K. Gautom, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ. Microbiol.* **1**:357-367.
- Hurt, M., S. Apte, H. Leher, K. Howard, J. Niederkorn, and H. Alizadeh.** 2001. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect. Immun.* **69**:2988-2995.
- Gast, R. J., D. R. Ledee, P. A. Fuerst, and T. J. Byers.** 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four

nuclear 18S rDNA sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**:498-504.

Gallegos E. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis de Potosí. México D.F.:Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México; 1997. [Tesis Doctoral].

Gelman B, Rauf S, Nader R, Popov V, Bokowski J, Chaljub G, Nauta H. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J Am Med Assoc.* 2001; **285**:2450-51.

Grunnet, M. L., G. H. Cannon, and J. P. Kushner. 1981. Fulminant amoebic meningoencephalitis due to *Acanthamoeba*. *Neurology* **31**:174-176.

Jager B, Stamm W. 1972 Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet.* **2**:1343-45.

Jeric, M. 2007 Amebas de vida libre género *Acanthamoeba*. *Rev Chil Infect;* **24 (6)**: 491-492

John, DT. (1993), Opportunistically pathogenic free-living amoebae. In: Kreier, JP & Baker, JR (eds.). *Parasitic protozoa*, Academic Press, San Diego California, U.S.A., 2(3): 143-246.

Joklik W, Wilett H, Amos B, Wilfert C. *Zinsser Microbiologia.* 20 ed. Editorial Argentina:Médica Panamericana; 2000.

Jones, B. R., G. S. Visvesvara, and N. M. Robinson. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* **95**:221-232.

Khan, N. A., E. L. Jarroll, and T. A. Paget. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr. Microbiol.* **43**:204-208.

Kilvington, S., D. F. Larkin, D. G. White, and J. R. Beeching. 1990. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2722-2725.

Lehmann, O. J., S. M. Green, N. Morlet, S. Kilvington, M. F. Keys, M. M. Matheson, J. K. Dart, J. I. McGill, and P. J. Watt. 1998. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **39**:1261-1265.

Marciano-Cabral, F., R. Puffenbarger, and G. A. Cabral. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**:29-36.

Marciano-Cabral, F. Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, April **16 (2)**: 273-307.

Martinez, A. J. 1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection? *Neurology* **30**:567-574.

Martinez JA. Infection of the Central Nervous System Due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991; **13(Suppl 5)**: S399-402

Martinez, A. y Janitschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; a review. *Infection.* **13**: 251-256

Martínez, J. A. and Visvesvara, G. (1997), Free-living, amphizoic and

opportunistic amibas, *Brain Pathol.*, 7: 583-598.

Mazur T, Hadas E, Iwanicka I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol.* 1995; **46**:106-8.

Nagington, J., Watson, P. G., Play Fair, T. J., Me Gill, J., Jones, B. R. and

McSteel, A. D. (1974) *Lancet*, **2**, 1537.

Narváez J. Encefalitis amebiana primaria granulomatosa. *Diagnóstico.* 1996;35:13-9.

Navarro P, Tejada A, Suárez R, Espinoza Y. Presentación de un caso de acanthamoebiasis cutánea procedente de Cajamarca. Cuarto Congreso de Parasitología, Libro de Resúmenes, Setiembre 2000.

Niederborn, J. Y. 2002. The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba* keratitis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsaw)* **50**:53-59.

Niszl, I. A., R. B. Veale, and M. B. Markus. 1998. Cytopathogenicity of clinical and environmental *Acanthamoeba* isolates for two mammalian cell lines. *J. Parasitol.* **84**:961-967.

Page, F. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.* **116**:149-184

Pelczar, J., Reid D. y Chan, S. 1983. *Microbiología.* Mac Graw Hill, Nueva York. 826 pp.

Rivera, f., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz R.,

Hernandez, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-born pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* **74**:65-87

Rivera, F., Lares, F., Bonilla, P., Ramirez, E., Ramírez, P. Y Paulin, A. 1988. Pathogenic Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. **En:** hazardous Waste: Detection, Control, Treatment. Ed. Por Abbou, R. Elsevier Science, Amsterdam: 1175-1179

Rivera, F., Ortega, A., Lopez-Ocheoterena, E. y Paz, M. 1979. A quantitative morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **98**: 465-469.

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P. y Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* **42**: 149-154.

Rodriguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Rev. Microbiol.* **20** (3): 225-241.

Rondanelli, E. G. (1987), Amphizoic amoebae human pathology, *Infection diseases*, Ed. Piccin Nuova libreria. Padua Italy. p. 279.

Schroeder, J. M., G. C. Booton, J. Hay, I. A. Niszl, D. V. Seal, M. B. Markus, P. A. Fuerst, and T. J. Byers. 2001. Use of subgenomic 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.

- Schuster F, Visvesvara G.** Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004; 34:1001-27.
- Schuster F, Visvesvara G.** Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat.* 2004;7:41-51
- Schuster, F. L.** 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:342-354
- Schuster, F. L., and G. S. Visvesvara.** 1998. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**:612-618
- Sungmi J, Schelper R, Visvesvara G, Chang H.** Balamuthia mandrillaris: Meningoencephalitis in an Immunocompetent Patient: An Unusual Clinical Course and a Favorable Outcome. *Arch Pathol Lab Med.* **2004**; **128**:466-68.
- Stothard, D. R., J. M. Schroeder-Diedrich, M. H. Awwad, R. J. Gast, D. R. Ledee, S. Rodriguez-Zaragoza, C. L. Dean, P. A. Fuerst, and T. J. Byers.** 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.
- Stothard, D. R., J. Hay, J. M. Schroeder-Diedrich, D. V. Seal, and T. J. Byers.** 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.
- Stratford, M. P., and A. J. Griffith.** 1978. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* **108**:33.
- Stewart, G. L., I. Kim, K. Shupe, H. Alizadeh, R. Silvany, J. P. McCulley, and J. Y. Niederkorn.** 1992. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *J. Parasitol.* **78**:849-855.
- Toney, D. M., and F. Marciano-Cabral.** 1998. Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. *J. Parasitol.* **84**:338-344.
- Tyndall, R., Ironside, K., Metler, P., Tan, E., Hazen, T. y Fliermans, C.** 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 722-732
- Turner, N. A., J. Harris, A. D. Russell, and D. Lloyd.** 2000. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.* **89**:751-759.
- Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ.** *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N.Sp., Agent of Amebic Meningoencephalitis in Human and Other Animals. *J Euk. Microbiol* 1993; 40 (4): 504-514.
- Walochnik, J., A. Hassl, K. Simon, G. Benyr, and H. Aspöck.** 1999. Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living

amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). Parasitol. Res. **85**:601-603.

Walochnik, J., A. Obwaller, E. M. Haller-Schober, and H. Aspöck. 2001. Anti-*Acanthamoeba* IgG, IgM, and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. Parasitol. Res. **87**:651-656

Wellings, F., Amuso, S. y Lewis, A. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1950-1957

Wellings, F., Amuso, S. y Lewis, A. Farmelo, M., Moody, D. y Osikowicz, C. 1979. Pathogenic *Naegleria*, Distribution in Nature. Publication of the Environmental Protection Agency, Cincinnati, EPA/600/1-79-018.

Wilhelmus, K. R., M. S. Osato, R. L. Font, N. M. Robinson, and D. B. Jones. 1986. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. *Arch. Ophthalmol.* **104**:1309-1312.