

Berbeli Astorga Leiva

Ecología de *Acanthamoeba spp.*  
en Chile: identificación fenotípica y  
genotípica en agua, suelos y  
vegetales

Departamento

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud  
Pública

Director/es

Clavel Parrilla, Antonio  
Goñi Cepero, María Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>





**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ECOLOGÍA DE *ACANTHAMOEBA*  
*SPP.* EN CHILE: IDENTIFICACIÓN  
FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA EN  
AGUA, SUELOS Y VEGETALES**

Autor

Berbeli Astorga Leiva

Director/es

Clavel Parrilla, Antonio  
Goñi Cepero, María Pilar

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

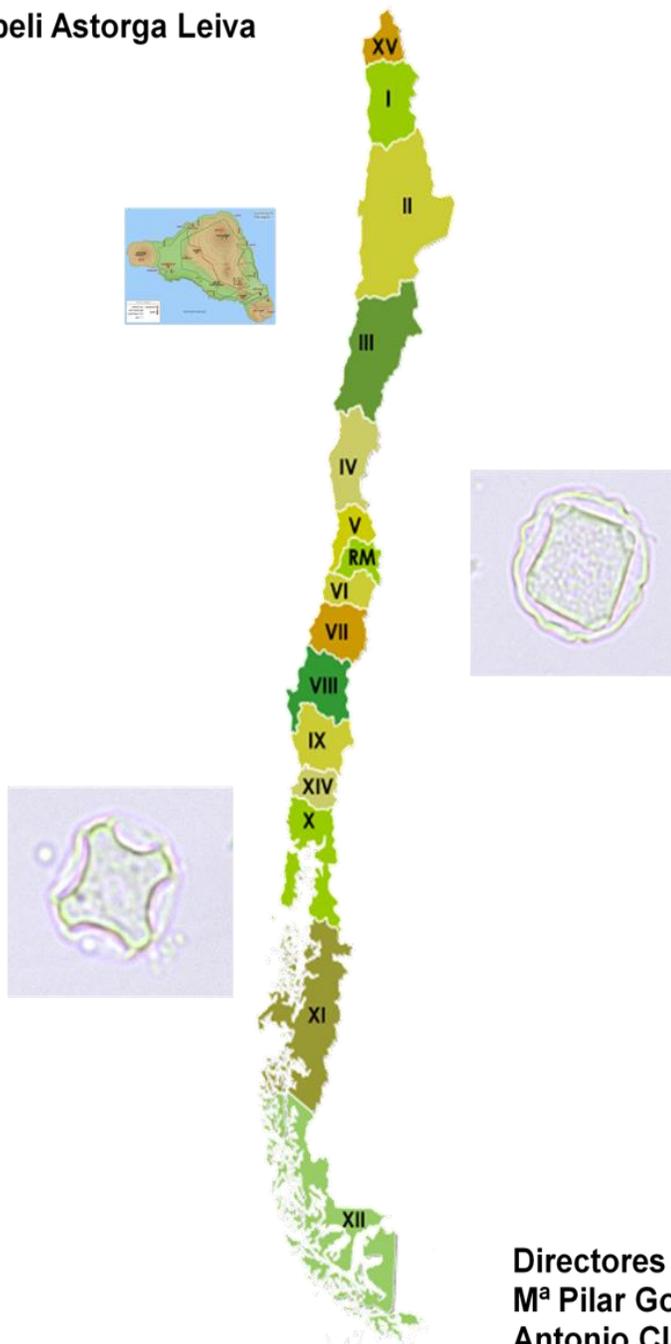
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

2016



**ECOLOGÍA DE *Acanthamoeba* spp. EN CHILE: IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA  
Y GENOTÍPICA EN AGUA, SUELO Y VEGETALES**

Autora: Berbeli Astorga Leiva



**Directores**  
**M<sup>a</sup> Pilar Goñi Cepero**  
**Antonio Clavel Parrilla**



***A la memoria de mis Padres  
y de mi amiga Patricia Neira Otero***



## AGRADECIMIENTOS

---

Han pasado muchos años y ha sido un largo camino que está en su etapa final, quiero agradecer a mis tutores, a la Dra. M. Pilar Goñi Cepero y al Dr. Antonio Clavel Parrilla, esta gran oportunidad y apoyo profesional, sobretodo en esta etapa de mi vida. Agradecer a todos los integrantes del laboratorio de Parasitología por su ayuda en mis breves estadías y a todos los integrantes del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública.

Agradecer a todas las personas, familiares, amistades, colegas, compañeros de trabajo que colaboraron en la etapa inicial de recolección de las muestras, a los que me acompañaron en largas jornadas recogiendo muestras a lo largo del país. A los integrantes del Laboratorio de Parasitología Ambiental y al vital apoyo y colaboración del Subdepartamento de Genética Molecular del Instituto de Salud Pública de Chile, a cargo del Dr. Jorge Fernández, sin su gran apoyo técnico y profesional no hubiera sido posible finalizar esta tesis. Agradecimientos al fundamental análisis estadístico de Carolina Zacharzewski.

Un gran recuerdo a mi amiga Patricia Neira Q.E.P.D. quién me impulsó a retomar estos estudios y llegar a esta etapa, la que ella no pudo lograr.

Mis recuerdos y agradecimientos a los sacrificados docentes de la Universidad de Zaragoza que viajaron al extremo norte de Chile, a la ciudad de Arica, a impartir las diferentes materias y dar inicio a los Programas de Doctorado para docentes en la Universidad de Tarapacá. Agradecimientos a la Universidad de Tarapacá, al aceptar que me integrara en este desafío.

**A todos: ¡Muchas gracias!.**



# ***ÍNDICE***



# ÍNDICE

---

<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
- Información general .....	31
<b>A. Información general del país .....</b>	<b>31</b>
1. Características geográficas .....	31
2. Características demográficas .....	32
3. Índice de Desarrollo Humano .....	32
<b>B. Sistema de Salud Chileno .....</b>	<b>32</b>
1. Aspectos generales .....	32
2. Financiamiento de la salud .....	33
3. Sistema público de salud .....	33
3.1 Sistema Nacional de Servicios de Salud .....	33
3.2 Ministerio de Salud de Chile .....	33
<b>C. Instituto de Salud Pública de Chile .....</b>	<b>34</b>
1. Definición .....	34
2. Organización administrativa .....	34
2.1 Departamento Salud Ambiental .....	35
2.1.1 Sub departamento del Ambiente .....	35
2.1.1 Sección Parasitología Ambiental .....	35
<b>II A. Amebas de Vida Libre (AVL) .....</b>	<b>36</b>
1. Introducción .....	36
2. Ciclo de vida .....	36
3. Taxonomía .....	37
4. Amebas patógenas para el ser humano .....	37
<b>B. Aspectos generales de AVL patógenas para el ser humano .....</b>	<b>38</b>
1. <i>Naegleria fowleri</i> .....	38
2. <i>Balamuthis mandrillaris</i> .....	39
3. <i>Vermamoeba vermiformis</i> .....	39
4. <i>Sappinia diploidea-Sappinia pedata</i> .....	40
5. <i>Paravahlkamfia francinae n. sp</i> .....	41

<b>III <i>Acanthamoeba</i> spp</b> .....	<b>42</b>
1. Introducción .....	42
2. Epidemiología .....	44
3. Morfología .....	47
4. Actuación de los desinfectantes .....	49
5. Diagnóstico de laboratorio .....	49
5.1 Diagnóstico fenotípico .....	49
5.1.1 Métodos directos .....	49
5.1.2 Métodos por concentración .....	50
5.1.3 Cultivo monoxénico y axénico .....	50
5.2 Diagnóstico molecular .....	51
5.2.1 PCR .....	51
5.2.2 PCR Tiempo Real, PCR Tiempo Real Rápido y .....	52
5.2.3 PCR múltiple Tiempo Real .....	52
5.3 Diagnóstico indirecto .....	52
6. Diagnóstico por imágenes .....	52
7. Patogénesis .....	55
7.1 Factores directos de virulencia .....	55
7.1.1 Adhesión .....	55
7.1.2 Fagocitosis .....	55
7.1.3 Proteasas .....	55
7.2 Factores indirectos de virulencia.....	56
7.2.1 Características morfológicas.....	56
7.2.2 Termotolerancia, osmotolerancia y crecimiento a diferentes pH .....	56
7.2.3 Diferenciación celular .....	56
7.2.4 Quimiotaxis .....	56
7.2.5 Ubicuidad .....	57
7.2.6 Biofilms .....	57
7.2.7 Factores del hospedador .....	57
8. Inmunorespuesta a infección por <i>Acanthamoeba</i> .....	57
9. Aspectos clínicos .....	58
9.1 <i>Acanthamoeba</i> cutánea .....	60

9.2	Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)	61
9.3	Infección en paciente con SIDA	62
9.4	Queratitis	63
10.	Endosimbiosis	65
11.	Tratamiento	68
11.1	Terapia de infección cutánea	68
11.2	Terapia en EGA	69
11.3	Infección diseminada	69
11.4	Terapia en queratitis	69
12.	Prevención	70
13.	Infección en animales	70

#### **IV Objetivos.....71**

1.	Objetivo general	73
2.	Objetivos específicos	73

#### **II MATERIAL Y MÉTODOS .....75**

1.	Diseño metodológico	77
2.	Población objetivo	77
3.	Cálculo del tamaño de la muestra	77
4.	Toma de las muestras	77
4.1	Muestras de agua	79
4.2.	Muestras de suelo	82
4.3.	Muestras de vegetales	84
5.	Procesamiento de las muestras	86
5.1	Muestras de agua	86
5.2	Muestras de suelo	86
5.3	Muestras de vegetales.....	87
5.4	Procesamiento de muestras de agua, suelo y vegetales	
	mediante membrana filtrante.....	87
5.4.1	Equipos	87
5.4.2	Materiales.....	87
5.4.3	Medios de cultivo y reactivos	88

5.5 Cultivo <i>Escherichia coli</i> .....	90
5.5.1 Preparación de emulsión de <i>Escherichia coli</i> .....	90
5.6 Preparación de agar para cultivo de AVL .....	90
5.7 Procedimiento de filtración de las muestras .....	90
5.8 Cultivo de las muestras .....	91
5.9 Aislamiento de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	92
6 Análisis fenotípico .....	92
6.1 Clasificación de Pussard y Pons .....	93
6.2 Obtención de amebas concentradas para extracción de ADN .....	94
7 Análisis genotípico .....	94
7.1 Extracción de ADN .....	95
7.1.1 Extracción con reactivos comerciales.....	95
7.1.2 Extracción por shock térmico .....	95
7.2 Análisis por PCR .....	96
7.2.1 Equipos .....	97
7.2.2 Reactivos.....	97
7.2.3 Mix por reacción.....	97
7.2.4 Reacción de amplificación.....	98
7.2.5 Amplificación.....	98
7.3 Electroforesis en gel .....	99
7.3.1 Equipos.....	99
7.3.2 Materiales.....	99
7.3.3 Reactivos.....	100
7.3.4 Procesamiento .....	100
7.3.4.1 Preparación del agar.....	100
7.3.4.2 Llenado del soporte con el agar.....	100
7.3.4.3 Llenado de las ranuras del agar con los controles y muestras.....	101
7.3.4.4 Ubicación del gel en el transiluminador y fotografía.....	101
7.3.5 Purificación de banda para secuenciación.....	101
7.3.6 Repetición de muestras no confirmadas por PCR .....	102
7.4 Secuenciación .....	102
7.4.1 Secuenciación en España.....	102

7.4.2	Secuenciación en Chile .....	102
7.4.3	Repetición de muestras no secuenciadas .....	102
7.4.4	Elaboración de árboles filogenéticos .....	102
8	Parámetros de análisis .....	105
8.1	Agrupación de regiones en 3 zonas .....	105
8.2	Clasificación de las muestras de acuerdo a la estación de toma de muestras.....	106
8.3	Clasificación de las muestras de agua de acuerdo a su uso.....	106
8.4	Día de positividad de los cultivos.....	106
8.5	Muestras de agua de piscinas.....	107
8.6	Determinación del grado de termotolerancia a las amebas aisladas..	107
9	Conservación de <i>Acanthamoeba</i> spp. genotipadas.....	108
10.	Diseño de díptico.....	108
11.	Análisis estadístico .....	109

### **III RESULTADOS.....113**

#### **A. Resultados de la totalidad de las muestras..... 116**

##### **1. Resultados morfológicos de la totalidad de las muestras..... 116**

1.1	Contaminación de los cultivos con larvas de nematodos, ácaros, hongos y otras AVL.....	116
1.1.1	Contaminación por larvas.....	116
1.1.2	Contaminación por ácaros.....	117
1.1.3	Contaminación por hongos .....	118
1.1.4	Contaminación con otras AVL .....	119
1.2	Resultados morfológico de <i>Acanthamoeba</i> spp .....	120
1.3	Resultado por tipo de muestras.....	122
1.4	Resultados por Regiones.....	123
1.5	Resultados por Zonas.....	126
1.6	Resultados por Estaciones.....	128
1.7	Resultados de termotolerancia.....	128
1.8	Resultados de <i>Acanthamoeba</i> spp. de acuerdo a la clasificación..... de Pussard y Pons.	129
1.9	Resultado de temperatura de aislamiento de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	131

1.10 Positividad de los cultivos por día de incubación a 25°C y 37°C.....	132
<b>2. Resultados del análisis molecular de la totalidad de las muestras .....</b>	<b>134</b>
<b>2.1 Genotipificación de <i>Acanthamoeba</i> spp.....</b>	<b>134</b>
<b>B. Resultado de muestras de agua.....</b>	<b>142</b>
1 Resultado morfológico de las muestras de agua.....	142
1.1 Resultado de análisis de agua de piscinas.....	147
2 Resultado del análisis molecular de las muestras de agua.....	152
<b>C. Resultado de muestras de suelo.....</b>	<b>160</b>
1 Resultado morfológico de las muestras de suelo .....	160
2 Resultado del análisis molecular de las muestras de suelo.....	166
<b>D. Resultado de muestras de vegetales.....</b>	<b>171</b>
1 Resultado morfológico de las muestras de vegetales.....	172
2 Resultado del análisis molecular de las muestras de vegetales.....	177
<b>E.Resultados de análisis filogenético de <i>Acanthamoeba</i> spp.....</b>	<b>182</b>
<b>IV DISCUSIÓN.....</b>	<b>199</b>
<b>A. Análisis de las muestras totales.....</b>	<b>203</b>
1. Análisis morfológico en la totalidad de las muestras.....	203
1.1 Análisis de las muestras por Regiones.....	203
1.2 Análisis de las muestras por zonas.....	204
1.3 Análisis de estacionalidad.....	204
1.4 Análisis de clasificación de Pussard y Pons.....	205
1.5 Termotolerancia.....	205
1.5.1 Termotolerancia a 42°C.....	205
1.5.2 Termotolerancia a 60°C.....	206
1.5.3 Temperatura de aislamiento de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	206
1.5.4 Día de positividad del cultivo.....	207
<b>2. Análisis molecular de <i>Acanthamoeba</i> spp. en la totalidad</b>	
<b>de las muestras.....</b>	<b>209</b>
<b>B. Análisis de las muestras de agua.....</b>	<b>210</b>
<b>1. Análisis de diversas metodologías de toma de las muestras y</b>	
<b>procesamientos.....</b>	<b>210</b>
1.1 Toma de las muestras.....	211

1.2 Análisis de aspectos metodológicos .....	212
<b>2. Análisis morfológico de muestras de agua.....</b>	<b>215</b>
2.1 Análisis <i>Acanthamoeba</i> spp. en agua.....	215
2.2 Análisis de tipo de muestras de agua.....	217
2.3 Análisis de estacionalidad.....	223
2.4 Análisis de termotolerancia.....	224
2.5 Análisis de clasificación de Pussard y Pons.....	226
<b>3. Análisis molecular de <i>Acanthamoeba</i> spp. en agua.....</b>	<b>227</b>
3.1 Genotipos de <i>Acanthamoeba</i> spp. en agua .....	227
<b>C. Análisis de las muestras de suelo.....</b>	<b>231</b>
<b>1. Análisis de diversas metodologías de toma de las muestras</b>	
<b>y procesamientos.....</b>	<b>231</b>
1.1 Toma de las muestras.....	231
1.2 Análisis de aspectos metodológicos.....	232
<b>2. Análisis morfológico de muestras de suelo.....</b>	<b>233</b>
2.1 Análisis <i>Acanthamoeba</i> spp. en suelo.....	233
2.2 Análisis de termotolerancia.....	233
<b>3. Análisis molecular de <i>Acanthamoeba</i> spp en suelo.....</b>	<b>234</b>
3.1 Genotipos de <i>Acanthamoeba</i> spp. en suelo.....	234
<b>D. Análisis de las muestras de vegetales.....</b>	<b>235</b>
<b>1. Análisis de diversas metodologías de toma de las muestras y</b>	
<b>procesamientos. ....</b>	<b>235</b>
1.1 Toma de las muestras.....	235
1.2 Análisis de aspectos metodológicos.....	235
<b>2. Análisis morfológico de muestras de vegetales.....</b>	<b>236</b>
2.1 Análisis <i>Acanthamoeba</i> spp. en vegetales.....	236
2.2 Endosimbiosis.....	237
2.3 Análisis de termotolerancia.....	238
<b>3. Análisis molecular de <i>Acanthamoeba</i> spp en vegetales.....</b>	<b>238</b>
3.1 Genotipos de <i>Acanthamoeba</i> spp. en vegetales.....	238
<b>E. Análisis filogenético de <i>Acanthamoeba</i> spp.....</b>	<b>239</b>
<b>V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>243</b>
<b>VI BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>249</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

---

### A. Introducción

1. Grupos de Pussard y Pons y especies de *Acanthamoeba* spp .....43
2. Información de genotipos T1-T20 de *Acanthamoeba* spp..... 54
3. Genotipos, especies, enfermedad y Grupos de Pussard y Pons.....59

### B. Material y Método

4. Secuencias de referencia usadas para la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp..... 103
5. Variables de interés en análisis estadístico.....110

### C. Resultados

6. Contaminación de cultivos de *Acanthamoeba* spp. con larvas..... 117
7. Contaminación de cultivos de *Acanthamoeba* spp. con ácaros.....117
8. Información detallada sobre la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp. de agua en este estudio. ....193
9. Información detallada sobre la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp. de suelos en este estudio. ....195
10. Información detallada sobre la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp. de vegetales en este estudio. ....197



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

### A. Introducción

1. Organigrama resumido de la dependencia del ISP con el MINSAL.....	33
2. Organigrama del Departamento de Salud Ambiental.....	35
3. Esquema sobre actuación como “caballo de Troya” de <i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>Balamuthia mandrillaris</i> . ....	66

### B. Material y Método

4. Mapa de Chile con número total de muestras por Regiones.....	78
5. Mapa de Chile con número de muestras de agua por Regiones.....	82
6. Mapa de Chile con número de muestras de suelo por Regiones.....	84
7. Mapa de Chile con número de muestras de vegetales por Regiones.....	85
8. Mapa de Chile con el total de muestras por zonas. ....	106
9. Diseño de fases del estudio.....	111

### C. Resultados

10. Genotipificación de muestras de <i>Acanthamoeba</i> spp. aisladas de aguas, suelos y vegetales. ....	182
11. Genotipificación de muestras de <i>Acanthamoeba</i> spp. aisladas de aguas.....	183
12. Genotipificación de muestras de <i>Acanthamoeba</i> spp. aisladas de suelos. ....	184
13. Genotipificación de muestras de <i>Acanthamoeba</i> spp. aisladas de vegetales. ....	185
14. Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T4 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. ....	186
15. Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T5 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. ....	188
16. Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T15 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. ....	189
17. Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T11 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. ....	190

18. Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T3 mediante la herramienta bioinformática ClustalW.....	191
19. Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T2 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. ....	192

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

---

### III Resultados

1. Distribución de muestras de aguas, suelos y vegetales.....	115
2. Resultado de análisis morfológico.....	120
3. Resultados totales por tipo de muestra.....	122
4. Muestras tomadas por Región según su origen.....	123
5. Resultados de muestras totales por Región.....	124
6. Positivos por Región según muestra.....	125
7. Número de muestras totales distribuidas por zonas.....	126
8. Resultados totales por zonas.....	127
9. Resultados totales por estaciones.....	128
10. Clasificación morfológica de Pussard y Pons.....	129
11. Temperatura de aislamiento de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	131
12. Cultivos positivos por día de incubación a 25°C.....	132
13. Cultivos positivos por día de incubación a 37°C.....	133
14. Porcentaje de genotipos de <i>Acanthamoeba</i> spp. en las 170 muestras.....	134
15. Distribución de genotipos según muestras.....	135
16. Distribución de los genotipos por Regiones.....	136
17. Distribución de los genotipos por zonas.....	137
18. Distribución de genotipos según estación.....	138
19. Clasificación de Pussard y Pons en la totalidad de las muestras.....	139
20. Comparación de días de positividad a 25°C según genotipo.....	140
21. Comparación de días de positividad a 37°C según genotipo.....	141
22. Resultado según tipo de muestras de agua.....	142
23. Resultado de muestras de agua por Regiones.....	143
24. Resultado de muestras de agua por zonas.....	144
25. Resultado de muestras de agua por estaciones.....	145
26. Resultado por uso de las aguas.....	146
27. Clasificación de Pussard y Pons en muestras de agua.....	147
28. Resultado de agua de piscinas por Regiones.....	148

29. Cumplimiento del Reglamento de Piscinas.....	149
30. Resultado de agua de piscinas y cumplimiento de Reglamento.....	150
31. Genotipo por tipo de muestras de agua.....	152
32. Genotipos de agua por Regiones.....	153
33. Genotipo de agua por zonas.....	154
34. Genotipos en agua por estaciones.....	155
35. Distribución de genotipos por uso de aguas.....	156
36. Genotipos en agua y clasificación de Pussard y Pons.....	157
37. Genotipo en agua de piscinas por Región.....	158
38. Genotipo y cumplimiento de Reglamento de piscinas.....	159
39. Resultado por tipo de suelos.....	160
40. Resultado de las muestras de suelo por Región.....	161
41. Resultado de las muestras de suelo por zonas.....	162
42. Resultado de las muestras de suelo por estaciones.....	163
43. Clasificación de Pussard y Pons: muestras de suelo.....	164
44. Genotipos por tipo de suelos.....	166
45. Genotipos de suelos por Regiones.....	167
46. Genotipos de suelos por zona.....	168
47. Genotipo de suelos por estaciones.....	169
48. Clasificación de Pussard: genotipo de suelos.....	170
49. Resultado por tipo de vegetales.....	171
50. Resultado de muestras de vegetales por Regiones.....	172
51. Resultado de muestras de vegetales por zonas.....	173
52. Resultado de muestras de vegetales por estaciones.....	174
53. Clasificación de Pussard y Pons: muestras de vegetales.....	175
54. Genotipos por tipo de vegetales.....	177
55. Genotipos de vegetales por Regiones.....	178
56. Genotipos de vegetales por Zona.....	179
57. Genotipo en vegetales por estaciones.....	180
58. Genotipo en vegetales y clasificación de Pussard. Y Pons.....	181
59. Genotipo T4 variantes predominantes según su origen.....	187
60. Variantes genotipo T5 según muestra.....	188
61. Variantes genotipo T15 según muestra.....	189

62. Variantes genotipo T11 según muestra.....	190
63. Genotipo T3, única variante T3/1 según muestra.....	191
64. Variantes genotipo T2 según muestra.....	192



# ÍNDICE DE FOTOS

---

## A. Introducción

1. Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).....	34
2. Trofozoíto ameboídeo de <i>Naegleria fowleri</i> .....	38
3. Trofozoíto flagelar de <i>Naegleria fowleri</i> .....	38
4. Quiste de <i>Naegleria fowleri</i> .....	38
5. Trofozoíto y quiste de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	39
6. Trofozoítos en suelo de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	39
7. Trofozoíto en tejido de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	39
8. Trofozoíto de <i>Vermamoeba vermiformis</i> .....	40
9. Quiste de <i>Vermamoeba vermiformis</i> .....	40
10. Trofozoíto con doble núcleo de <i>Sappinia diploidea</i> .....	40
11. Quistes con 1 ó 2 núcleos de <i>Sappinia diploidea</i> .....	40
12. Trofozoíto de <i>Paravahlkamfia francinae</i> .....	41
13. Quistes de <i>Paravahlkamfia francinae</i> .....	41
14. Trofozoítos y quistes de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	48
15. Quistes en tejido de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	48
16. Quiste de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	48
17. Quiste con 2 ostiolos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	48
18. Quiste de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	48
19. y 20. Acanthamebiasis cutánea, casos Peruanos .....	60
21. Queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp .....	65
22. <i>Acanthamoeba</i> con bacterias.....	68
23. <i>Acanthamoeba</i> con <i>Cryptosporidium</i> spp .....	68

## B. Material y Método

24. Muestras de suelos y aguas .....	78
25. Muestreador a distancia .....	79
26. Puerto Talcahuano-VIII Región .....	79
27. Playa Anakena-Isla de Pascua-V Región .....	79
28. Río Antivero-VI Región .....	79
29. Humedal Lengua-VIII Región .....	80

30. Cascada La Virgen-Aysén-XI Región .....	80
31. Laguna Los Patos-Concepción-VIII Región .....	80
32. Salto Río Laja-VIII Región .....	80
33. Agua de Pozo-V Región .....	81
34. Agua de Pozo clorada-V Región .....	81
35. Agua de Salar Atacama-II Región .....	81
36. Agua de cráter Rano Kao-Isla de Pascua-V Región .....	81
37. Suelo rural-La Higuera-IV Región .....	83
38. Muestra de arena y suelo urbano-Isla de Pascua-V Región .....	83
39. Suelo de Río Maule-VII Región .....	83
40. Transporte de las muestras .....	83
41. y 42. Laboratorio de Parasitología Ambiental-ISP .....	86
43. Equipo de filtración, manifolds .....	91
44. Ubicación del filtro en copa de filtración .....	91
45. Llenado de muestra de agua en copa de filtración .....	92
46. Depósito de filtro en placa con medio ANN .....	92
47. Revisión microscópica de cultivos .....	92
48. Quiste de <i>Acanthamoeba</i> spp. con tinción tricrómica.....	92
49. <i>Acanthamoeba</i> spp. Grupo I (Clasificación de Pussard y Pons).....	93
50. <i>Acanthamoeba</i> spp. Grupo II (Clasificación de Pussard y Pons).....	93
51. <i>Acanthamoeba</i> spp. Grupo III (Clasificación de Pussard y Pons).....	94
52, 53 y 54 Recepción de muestras en laboratorio U. Zaragoza, enviadas desde Chile .....	95
55, 56 y 57. Equipo y reactivos para análisis de cloro y pH en agua de piscina .....	107
58. Piscina pública al aire libre .....	107
59. Piscina pública techada .....	107
60. Conservación de <i>Acanthamoeba</i> spp. genotipadas en tubo con ANN... ..	108
61. Díptico de prevención de infección por <i>Acanthamoeba</i> spp .....	108
62. Cultivo contaminado con ácaros y hongos .....	118
63. Cultivo contaminado por larvas .....	118
64. Quistes de <i>Acanthamoeba</i> spp. e hifas .....	118
65. Procedimiento de eliminación de hongos. Cultivo 8:00 hrs AM	

(hifas y trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.) .....	118
66. Cultivo 17:00 hrs, trofozoítos separados de las hifas.....	119
67. Corte del agar en sectores sólo con trofozoítos y traspaso a cultivo con medio nuevo .....	119
68. Cultivo 8:00 hrs AM, crecimiento sólo de trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp .....	119
69, 70 y 71 Ejemplos de otras AVL .....	120
72. Quistes de <i>Acanthamoeba</i> spp .....	121
73. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp .....	121
74. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp en división .....	121

### C. Resultados

75. <i>Acanthamoeba</i> spp. pertenecientes al Grupo II (Pussard) .....	130
76. <i>Acanthamoeba</i> spp. pertenecientes al Grupo I y II (Pussard).....	130
77. <i>Acanthamoeba</i> spp. pertenecientes al Grupo III (Pussard) .....	130
78. Gel de agarosa con marcador de peso molecular, controles .....	134
y muestras.	
79. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 17 A.....	151
80. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 242 A.....	151
81. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 108 A.....	151
82. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 313 A.....	151
83. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 23S.....	165
84. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 26S.....	165
85. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 92S.....	165
86. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 59S.....	165
87. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 9V.....	176
88. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 58V.....	176
89. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 16V.....	176
90. Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp. a 42°C de la muestra 51V.....	176



# ***INTRODUCCIÓN***



# INTRODUCCIÓN

---

## I. INFORMACIÓN GENERAL

Este estudio se realizó con muestras ambientales tomadas en la República de Chile, continental e insular, por lo cual, se describen brevemente algunos aspectos generales del país, de su sistema de salud y de la Institución donde se ejecutó la mayor parte del trabajo de análisis técnico.

### A. INFORMACIÓN GENERAL DEL PAÍS

**1. Características geográficas:** El país está ubicado en el extremo sudoeste de América del sur, es definido como un país tricontinental, por su presencia en América, Oceanía y la Antártida. En América se extiende entre los paralelos 17°29'57"S y 56°32'12" S, alcanzando un largo de 4.270 Km, el ancho máximo es de 445 Km y el ancho mínimo de 90 Km. Chile Insular corresponde a un conjunto de Islas de origen volcánico en el Océano Pacífico Sur. Entre las mayores islas está el Archipiélago de Juan Fernández que se encuentra en Sudamérica, Isla Salas y Gómez e Isla de Pascua geográficamente ubicadas en la Polinesia, con una superficie de 756.095 Km<sup>2</sup> y el territorio Antártico Chileno, que aumenta su superficie a 1.250.257 Km<sup>2</sup>.

El país se divide en áreas geográficas que son: Norte Grande con clima desértico, Norte Chico con clima semiárido, Valle Central con clima templado, región de Los Canales con clima de lluvia y nieve y continente Antártico con clima Polar. La pluviosidad va en aumento de norte a sur. En Isla de Pascua se encuentra un clima tropical fresco y está ubicada a 3.700 Km del continente, el Archipiélago Juan Fernández tiene clima subtropical y se encuentra a 670 Km del continente.

Aproximadamente el 70% de la superficie del país es montañosa y sólo el 7% de la tierra es cultivable. Chile cuenta con unos 3000 volcanes, de los cuales, 150 están activos. La Cordillera de Los Andes que se sitúa al este del país, origina numerosos e importantes ríos que corren de este a oeste, a todo lo largo del país. Estos ríos riegan los valles, en los que hay buenos suelos de origen fluvial y generalmente de

buena fertilidad y permeabilidad. La mayoría de los ríos son cortos y torrentosos, sólo 36 de ellos llevan cantidades significativas de agua. En relación a los suelos, la mayoría de los suelos de la zona central y zona norte son suelos de textura mediana, otros son de textura pesada, siendo escasos los suelos de textura liviana. En las zonas centro-sur y sur se encuentran suelos de origen volcánico que corresponden a suelos de textura mediana. Tales condiciones de clima, suelo y agua hacen posible una amplia diversificación de la agricultura chilena, (García Hernán, 1982; Luzio et al, 2006).

**2. Características demográficas:** la población del país es de 16.634.603 habitantes, distribuida en 8.532.713 mujeres y 8.101.890 hombres, la población urbana es de 14.462.858 habitantes y rural de 2.171.745 habitantes. El país está clasificado en tipo de población madura, la población sobre 60 años, en el 2015 es de 17%, los menores de 15 años representan el 21% de la población y la tasa de fecundidad es de 1,8 hijos por mujer en edad fértil, ([www.ine.cl](http://www.ine.cl) censo 2012).

**3. Índice de Desarrollo Humano (IDH):** En el año 2014 el Informe Mundial de Desarrollo Humano ubicó a Chile en el puesto número 41 de la clasificación mundial y en primer lugar en América Latina y el Caribe, con un valor IDH de 0,822 (en una escala de cero a uno), una esperanza de vida al nacer de 80 años, 15,1 años esperados de instrucción y mostrando un nivel de desarrollo humano muy alto (PNUD Informe de desarrollo humano 2014).

## **B. SISTEMA DE SALUD CHILENO**

### **1. Aspectos generales**

El sistema de salud está integrado por instituciones, organismos y entidades pertenecientes al sector público y al sector privado, constituyendo un sistema de salud mixto. El subsector público está representado principalmente por el Fondo Nacional de Salud (FONASA) en su aspecto financiero y por el Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS) en su componente de prestación de servicios. El

subsector privado está principalmente representado por las Instituciones de Salud Privada (ISAPRE) y Mutuales en su aspecto financiero previsional y los profesionales y centros asistenciales privados en su componente de prestación de servicios. La distribución de la población según el sistema de salud en el sector público es de 69,5%, en ISAPRES 16,3% y en otros (Fuerzas armadas, universidades y otros) es de 14,2%. ([www.isapre.cl](http://www.isapre.cl)).

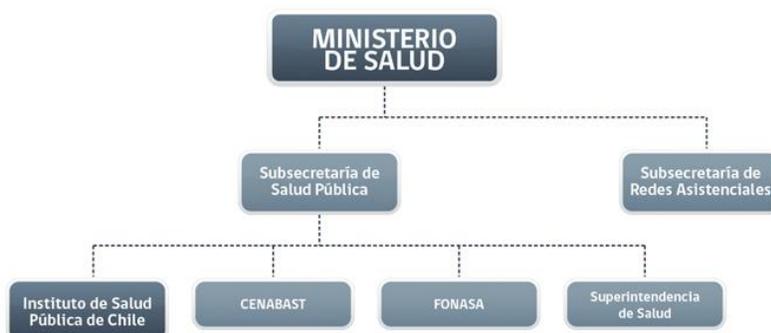
**2. Financiamiento de la salud:** entre las fuentes de financiamiento se encuentran, los impuestos directos e indirectos, administrados por el gobierno, los tributos municipales o comunales, administrados por las municipalidades. La cotización obligatoria de los trabajadores a FONASA o ISAPRE que es de 7% del salario, entre otros.

### 3. SISTEMA PÚBLICO DE SALUD

**3.1 SNSS:** está integrado por el Ministerio de Salud (MINSAL) y sus organismos dependientes: FONASA, CENABAST, la Superintendencia de Salud y el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

**3.2 EI MINSAL:** se divide en 2 Subsecretarías, de Redes Asistenciales y de Salud Pública.

**Figura N°1.** Organigrama resumido de la dependencia del ISP con el MINSAL.



## C. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

**1. Definición:** Es un servicio público, que posee autonomía de gestión y está dotado de personalidad jurídica y de patrimonio propio, dependiendo del Ministerio de Salud para la aprobación de sus políticas, normas y planes generales de actividades, así como en la supervisión de su ejecución.

Foto N°1

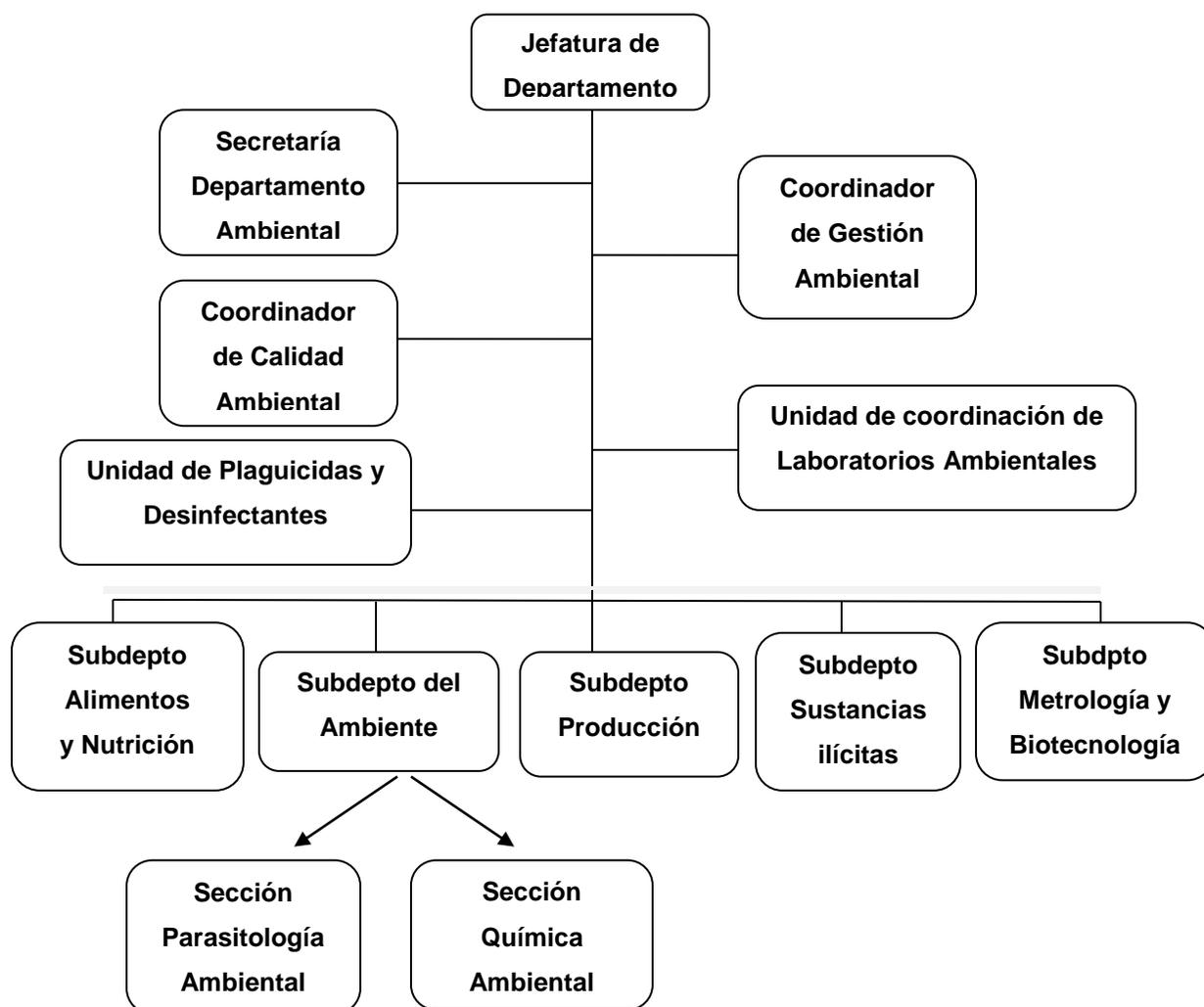


**2. Organización administrativa:** el ISP está formado por 5 departamentos técnicos: ANAMED (Agencia Nacional de Medicamentos), Laboratorios Biomédicos, Salud Ocupacional, Salud Ambiental, Asuntos Científicos y un departamento de apoyo a la gestión que es Administración y Finanzas. Dependiendo directamente de la Dirección está la Unidad de Calidad, que es fundamental para el mejoramiento continuo de la calidad institucional en los procesos técnicos y administrativos, basados en las Normas ISO (International Organization for Standardization).

**2.1 Departamento Salud Ambiental:** el Departamento está formado por 5 sub departamentos, uno de ellos es el sub departamento del ambiente.

**2.1.1 Sub departamento del Ambiente:** este sub departamento está integrado por la Sección de Parasitología Ambiental y la Sección de Química Ambiental y su sistema de calidad está basado en la Norma Chilena NCh-ISO 17025:2005.

**Figura N°2.** Organigrama del departamento de Salud Ambiental.



**2.1.1.1 Sección Parasitología Ambiental:** fue creada en el año 2012, anteriormente desde el 2001, fue Laboratorio de Parasitología Ambiental dependiente de la Sección de Microbiología de Alimentos y Agua. En las metodologías de ensayo

implementadas están las que se realizan en alimentos (pescado y platos preparados, carne de cerdo, jabalí y cecinas, verduras, berries, moluscos bivalvos) y las que se realizan en matrices ambientales (agua, suelo, aire).

## **II. A. Amebas de Vida Libre (AVL).**

**1. Introducción:** Las AVL son protozoos eucariotas, aerobios, mitocondriales, que se encuentran en todo tipo de ambiente y tienen gran importancia ecológica. Son protozoos heterótrofos y tienen la capacidad de alimentarse tanto de forma osmótrofa (consumen materia orgánica disuelta) y holozoica (ingieren bacterias, materia particulada y otros organismos) por fagocitosis, de esta forma controlan a las poblaciones de bacterias (Gallegos-Neyra y col, 2014). Son anfitriónicas por su capacidad de vivir como organismos de vida libre en la naturaleza y sólo ocasionalmente invadir a hospedadores y vivir como parásito dentro de tejido del hospedador. Existen más de 100 especies, de las cuales, algunas pueden potencialmente causar infección en humanos y animales, (Visvesvara et al, 2013).

Entre las diversas especies que existen en la naturaleza hay amebas desnudas (*Gymnamoeba*) y amebas testadas, estas últimas son amebas con caparazón, cuyo citoplasma se encuentra encerrado dentro de una testa, de la cual emergen los pseudópodos. Miden de 20 a 200µm y forman quistes de resistencia a cambios ambientales adversos, formando una membrana quística en la apertura de la testa (boca o pseudostoma), (Gallegos-Neyra et al, 2014).

**2. Ciclo de vida:** comprende dos estadios de viabilidad biológica, una forma activa que se alimenta y reproduce, llamada trofozoito y una forma inactiva de resistencia llamada quiste. El trofozoito se reproduce asexualmente por fisión binaria, dando lugar a 2 células hijas. En algunas amebas se presenta un estadio ameboflagelar temporal en el que el organismo no se alimenta ni se reproduce, sólo sirve para desplazarse a un mejor microambiente, el ciclo de vida pueden completarlo en el medio ambiente sin necesidad de un hospedador, (Gallegos-Neyra y col, 2014).

**2. Taxonomía:** La Sociedad Internacional de Protozoólogos basados en enfoques morfológicos, bioquímicos y filogenéticos propusieron una nueva clasificación. Los eucarióticos los ubicaron en 6 super grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveota y Excavata. *Acanthamoeba* y *Balamuthia* están clasificadas en el Super Grupo Amoebozoa: Acanthamoebidae. *Naegleria fowleri* en el Super Grupo Excavata: Heterolobosia: Vahlkampfiidae y *Sappinia* en el Super Grupo Amoebozoa: Flabellinea, Thecamoebidae, (Adl et al, 2005, Trabelsi et al, 2012; Visvesvara et al, 2013).

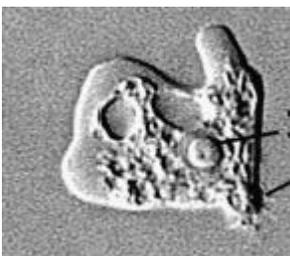
El supergrupo Amebozoa presenta generalmente pseudópodos no eruptivos llamados lobópodos, que pueden ser ramificados. Aquí se agrupan las gínamebas o amebas desnudas y un número importante de las amebas testadas. Las amebas del supergrupo Rhizaria se caracterizan por tener pseudópodos muy finos que pueden ser simples, ramificados, anastomosantes o con un soporte de microtúbulo (axópodos). En este grupo también se encuentran algunas amebas tecadas que forman su cubierta con placas silíceas. El supergrupo Opisthokonta agrupa una gran diversidad de organismos, las amebas consideradas aquí son organismos relacionados filogenéticamente con los “mohos del cieno” y algunos hongos que incluyen en alguna fase de su ciclo de vida una forma amebiana. En el supergrupo Chromalveolata también se agrupan protistas muy diversos, las amebas de este grupo pueden tener una red ectoplasmática sin paredes constituida por filamentos ramificados y anastomosantes. En el supergrupo Excavata se encuentra un conjunto de amebas que en muchos casos pueden tener una fase flagelada dentro de su ciclo de vida. En estos organismos predominan los pseudópodos eruptivos, aunque son diferentes de los que presentan los amebozoos, (Gallegos-Neyra et al, 2014).

**3. Amebas patógenas para el ser humano:** Miembros de sólo 6 géneros tienen una asociación con enfermedad humana: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Vermamoeba vermiformis*, *Sappinia pedata* (diploidea), *Paravahlkampfia francinae* y *Acanthamoeba* spp, las que se han descrito como causantes de infección del SNC causando queratitis amebianas o lesiones en la piel en el ser humano y animales, (Visvesvara Govinda, 2013; Gallegos-Neyra, 2014).

## B. Aspectos generales de AVL patógenas para el ser humano.

1. ***Naegleria fowleri***: ha sido aislada en muestras ambientales, en diferentes tipos de agua, de termas, de piscinas cloradas inadecuadas, recreacionales, reservas de agua domésticos, spas, ríos templados, agua dulce de grifos, en lagos o estanques. No se ha descrito en agua de mar, (Visvesvara et al, 2007). Más de 47 especies de *Naegleria* se han descritas basada en la secuencia del gen SS rRNA, (Visvesvara G., 2013). Es una ameboflagelada, en su ciclo evolutivo tiene tres estados, un trofozoíto ameboideo, otro trofozoíto transitorio que es flagelar y el quiste. Es termofílica y puede tolerar temperaturas hasta 45°C, proliferando durante los meses cálidos, (Visvesvara et al, 2007). El primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) debido a *Naegleria fowleri* lo publicaron Fowler y Carter en 1965, (Petit et al, 2006). La MAP es una meningoencefalitis aguda, fulminante, hemorrágica que se manifiesta con dolor de cabeza bifrontal o bitemporal, fiebre, náuseas, vómitos, irritabilidad, fatiga, rigidez de nuca, convulsiones y coma. La enfermedad progresa rápidamente y sin diagnóstico y tratamiento específico, el paciente muere generalmente dentro de 1 semana o menos, desde los primeros síntomas, (Petit et al, 2006; Visvesvara et al, 2007; Da Rocha-Azevedo et al, 2009). Investigadores indicaron que algunos de los casos reportados previamente como MAP primaria debido a *Naegleria fowleri* y que se recuperaron, pueden haber sido *Paravahlkampfia*, (Visvesvara et al, 2009; Chow et al, 2014).

Foto N°2



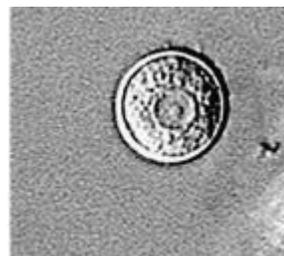
Trofozoíto ameboideo

Foto N°3



Trofozoíto flagelar

Foto N°4



Quiste

(Visvesvara G. et al, 2007)

**2. *Balamuthia mandrillaris*:** es una ameba del suelo, en muestras ambientales se ha aislado en suelo, polvo y agua siendo menos abundantes en el medio ambiente que otras amebas de vida libre. (Matin et al, 2008; Siddiqui et al, 2015). Presenta dos formas evolutivas, el trofozoíto y el quiste.

Foto N°5



Foto N°6

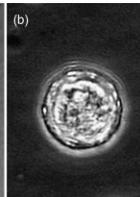
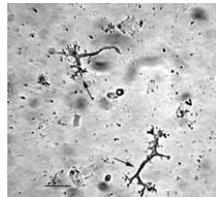


Foto N°7



a) Trofozoíto, b) Quiste  
(Visvesvara et al, 2007)

Trofozoítos en suelo  
(Dunnebacke et al, 2004)

En 1991, fue asociada con infección fatal humana involucrando al SNC produciendo una encefalitis hemorrágica necrotizante similar a Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA), (Visvesvara et al, 2007). Un análisis retrospectivo de casos de *Balamuthia* encefalitis amebiana en California, reveló que el 73% de los casos ocurrieron en hispanoamericanos (Schuster et al, 2004). Afecta a pacientes inmunocomprometidos, incluyendo pacientes HIV/SIDA, con cáncer, diabetes, alcohólicos y usuarios de drogas intravenosa, también se ha diagnosticado en pacientes inmunocompetentes, especialmente niños, jóvenes y adultos de tercera edad (Dunnebacke et al, 2004), últimamente se ha reconocido que *Balamuthia* puede ser transmitida a través de órganos, (Schlessinger et al, 2010). La enfermedad se presenta de dos formas: cutánea y cerebral (Siddiqui et al, 2015). En Chile, en el 2006, se publicaron 2 casos en autopsia (Cuevas y col, 2006; Oddó y col, 2006).

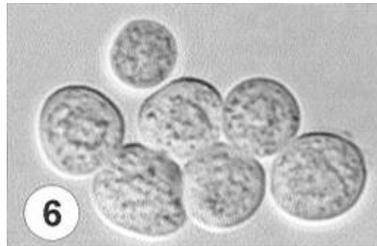
**3. *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*:** en el 2011, fue reclasificada en el género *Vermamoeba* (Smirnov et al, 2011), presenta dos formas evolutivas el trofozoíto y el quiste, los que son muy resistentes y pueden proteger a las bacterias de condiciones ambientales hostiles, (Fouque et al, 2014). Hasta hoy su patogenicidad está en controversia, (Abedkhojasteh et al, 2013). En el 1996, en

México, la aislaron en LCR de un hombre de 18 años con meningitis y bronconeumonía, (Centeno et al, 1996). En Bratislava, Eslovaquia, fue comunicado el primer caso de queratitis asociado a *Vermamoeba vermiformis* en una mujer usuaria de lentes de contacto, (Garajová et al, 2014).

**Foto N°8**



**Foto N°9**

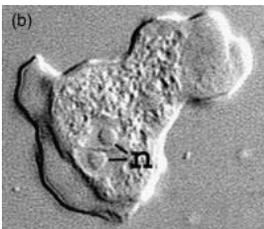


Trofozoítos de *V. vermiformis*    Quistes de *Hartmannella vermiformis*

Iva Dykova, 2005

**4. *Sappinia diploidea* - *Sappinia pedata*:** se han descrito dos especies, *Sappinia pedata* y *Sappinia diploidea*. Ha sido aislada de suelo, agua dulce, aire, hojarasca forestal, deposiciones de mamíferos, bisontes, alces, búfalos (Wylezich et al, 2009). Ha sido descrita en Europa, Norte América, Egipto, India y Japón. Presenta dos formas evolutivas, el trofozoíto y el quiste.

**Foto N°10**



**Foto N°11**



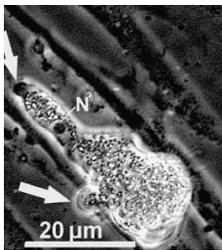
Trofozoíto con doble núcleo    Quistes con 1 y 2 núcleos  
(Visvesvara G. et al, 2007)

En el 2001 se publicó el primer y único caso de encefalitis amebiana causada por *Sappinia diploidea*, que más tarde fue re-clasificada como *Sappinia pedata* (Qvarnstrom et al, 2009; Wylezich et al, 2009). El paciente fue un hombre de Texas,

de 38 años, previamente sano, inmunocompetente, que desarrolló una Encefalitis granulomatosa. El paciente se recuperó después del tratamiento (Gelman et al, 2003).

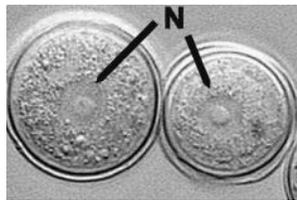
**5. *Paravahlkamfia francinae* n. sp.:** presenta dos formas evolutivas el trofozoíto y el quiste.

**Foto N°12**



Trofozoíto

**Foto N°13**



Quistes

(Visvesvara et al, 2009)

Fue aislada del LCR de un paciente con síntomas típicos de una meningoencefalitis amebiana primaria (Visvesvara et al, 2009), terminado el tratamiento con anfotericina B el paciente se recuperó después de unos pocos días de hospitalización sin ninguna secuela neurológica (Ozkoc et al, 2008). En Turquía se presentó un caso de queratitis por *Paravahlkamfia* sp en un hombre de 61 años con historia de trauma corneal y que no era usuario de lente de contacto, Este resultado indica que algunos de los casos reportados previamente como meningoencefalitis amebiana primaria y que se recuperaron podrían haber sido *Paravahlkamfia*. (Schuster et al, 2003; Visvesvara et al, 2009).

### III. *Acanthamoeba* spp.

#### 1. Introducción

El término “acanth” en griego significa espinas, fue agregado al término ameba para indicar la presencia de estructuras como espinas, ahora conocidas como acantopodios, (Khan et al, 2006). Son protozoos que se encuentran comúnmente en agua y suelo, sin embargo, sólo unas pocas especies son capaces de causar enfermedad en humanos.

En 1913, Puschkarew aisló una ameba desde polvo y la nombró *Amoeba polyphagus*, Page la nombró como *Acanthamoeba polyphaga*, (Visvesvara et al, 2013). En 1930, Castellani aisló una ameba que estaba como un contaminante en una placa de cultivo del hongo *Cryptococcus pararoseus* y que fue más tarde nombrada como *Acanthamoeba castellanii*, Culbertson en 1958, con un concepto avanzado planteó que las AVL pueden causar infección humana, (Marciano-Cabral et al 2003; Khan et al, 2006; Visvesvara G. 2013). Durante la producción de la vacuna de la poliomeilitis aislaron una ameba del cultivo de tejido pensando contener un virus desconocido, la inocularon en ratones y monos intracerebralmente tratados con cortisona y demostraron lesiones cerebrales de los animales que murieron una semana más tarde. La hipótesis de Culbertson fue que una infección similar podría ocurrir en el ser humano, este aislado fue nombrado como *Acanthamoeba culbertsoni*.

*Acanthamoeba* spp. fue previamente ubicada en el género *Hartmanella*. Sin embargo, en 1967 fue definitivamente clasificada como género separado por Page, respetando la designación genérica de *Acanthamoeba* creada por Volkonsky en 1931. Más tarde, Pussard y Pons en 1977, propusieron una clasificación basada principalmente en la morfología y medida del quiste en 3 grupos, (Nwachuku et al, 2003). En el grupo I estaban los quistes de tamaño sobre los 18µm, en el grupo II los quistes menores a 18µm y en el grupo III, los quistes menores a 19µm con endoquiste redondo u oval, (Schuster et al, 2004). Con esta clasificación se identificaron 18 especies, que fueron clasificadas en los 3 grupos.

En la Tabla N°1 se presentan 18 especies de *Acanthamoeba* spp. incorporadas en los 3 Grupos de Pussard y Pons, (Nwachuku et al, 2003).

**TABLA N°1**

**GRUPOS DE PUSSARD Y PONS Y ESPECIES DE *Acanthamoeba* spp.**

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellani</i>	<i>A. palestinensis</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. lenticulata</i>
	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. quina</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. rhyodes</i>	
	<i>A. divionensis</i>	
	<i>A. paradivionensis</i>	
	<i>A. griffini</i>	
	<i>A. triangularis</i>	

Actualmente, la identidad de más de 24 especies de *Acanthamoeba* se ha basado en criterios morfológicos. En el Grupo I fueron incorporadas *A. tubiashi*, (Stothard et al, 1998) y *A. byersi*, (Qvarnstrom et al, 2013). En el Grupo II se agregaron *A. hatchetti*, (Stothard et al, 1998) y *A. micheli* sp. Nov, (Magnet et al, 2014). En el Grupo III *A. healyi*, (Stothard et al, 1998) y *A. jacobsi*, (Hewett et al, 2003). Estas especies agrupadas en base a su morfología es considerado poco fiable porque las variaciones en la morfología de los quistes, puede ser causada por las condiciones del cultivo, (Visvesvara et al, 2013). Criterios inmunológicos, bioquímicos y fisiológicos también se han aplicado para la identificación de las diferentes especies de *Acanthamoeba*. Sin embargo, muchas especies comparten determinantes antigénicos, por lo tanto, los resultados obtenidos a través de inmunofluorescencia o western blot han sido poco concluyentes, (Marciano-Cabral et al, 2003).

**2. Epidemiología:** *Acanthamoeba* spp. se encuentran en todo el mundo. En el medio ambiente han sido aisladas de suelo, (Todd et al, 2015), arena, polvo en el aire, (Rodríguez-Zaragoza et al, 1993), abono, agua dulce (Montalbano et al, 2015) y salada, estanques de agua, lagos de agua dulce, lagos de agua salada, agua y suelo de la Antártida, (Brown et al, 1982; Biddick et al, 1984), agua de termas, agua de duchas, aguas residuales, depuradoras de lodos, agua embotellada mineral, agua destilada embotellada, plantas de energía nuclear, conductos de ventilación, torres de refrigeración, filtros de calefacción, unidades de calefacción, ventilación, (Khan et al 2006, Siddiqui et al, 2012; Visvesvara et al, 2013), equipos de aire acondicionado, (Astorga B et al, 2011; LI-Li et al, 2011), humidificadores, acuarios domésticos, tubos de jacuzzi, piscinas de hidroterapia en hospitales, unidad de diálisis, (Dendana et al, 2008), polvo en el aire, lentes de contacto, descarga de aire, vegetales, (Khan et al, 2006; Siddiqui et al, 2012; Visvesvara et al, 2013) unidades de riego dental, (Trabelsi et al, 2010). Los biofilms aumentan el N° de AVL en las líneas de agua de unidades dentales encontrando una frecuencia (3 veces) más alta en muestras de biofilms, (Retana-Moreira et al, 2015). Al estudiar muestras de polvo y biofilms en un Hospital, se encontró un 40% con *Acanthamoeba* y *Naegleria* con un 100% de positividad en muestras de biofilms. La explicación estaría en las amebas que se adhieren a ellos para alimentarse de las bacterias que los colonizan, la ameba también produce copas de alimentación (food cups o amebostomas) en su superficie e ingiere células epiteliales, (Barbeau et al, 2001). Protistas tales como las amebas, tienen dos importantes funciones ecológicas, influir en la estructura de la comunidad microbiana y mejorar el reciclaje de nutrientes. Entre los protistas, las AVL son los consumidores dominantes de bacterias y son responsables de hasta el 60% de la reducción total de la población bacteriana. En un estudio, el suelo que contiene *Acanthamoeba* y bacterias mostró significativamente mayor mineralización de carbono, nitrógeno y fósforo en comparación con el suelo que contiene las bacterias pero sin *Acanthamoeba*, (Siddiqui et al, 2012).

*Acanthamoeba* puede tolerar amplios rango de osmolaridad, temperatura, salinidad y pH, (Trabelsi et al, 2012). El primer caso de Queratitis por *Acanthamoeba* spp. (QA) en los Estados Unidos ocurrió en 1973 en un rancho del sur de Texas seguido de

un trauma de su ojo derecho. El número de casos aumentó gradualmente entre 1973 y 1984, y un dramático aumento comenzó en 1985, reflejando el aumento del uso de lentes de contacto entre la población, (Visvesvara G. 2013). En el año 2002, la incidencia predictiva de queratitis por *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto por millón ha sido estimada como 1,36 en USA, 3,06 en los Países Bajos y 149 en el este de Escocia, (Laummaunwai et al, 2011). Las informaciones indican que el 85% de los casos de queratitis por *Acanthamoeba* están asociados con individuos usuarios de lentes de contacto, (Nwachuku et al, 2003). Durante los años 2003-2008, un aumento sustancial (cuatro veces) en la incidencia de QA se observó en los EEUU, así como en otros países. Este aumento se ha asociado, en parte, a una formulación específica de lentes de contacto y a la reducción de una normativa de la EPA (Environmental Protection Agency) en uso del cloro para las plantas de tratamiento de aguas municipales, (Panjwani et al, 2010).

Se estima que hasta agosto del 2006 más de 5000 casos de QA han ocurrido en los Estados Unidos. La queratitis por *Acanthamoeba* no es enfermedad de notificación obligatoria, el actual número no es conocido y puede ser aún más alto. Trabajos publicados sugieren una incidencia de 0,58 a 0,71 casos/1.000.000 en la población general y 1.65 a 2.01/106 entre usuarios de lentes de contacto, (Nwachuku et al, 2003). Gran número de casos han sido reportados en el Reino Unido e India. Incidencia en el Reino Unido en la población general es de 1/1.000.000 anual, mientras que entre los usuarios de lentes de contacto esta cifra asciende a 17,5/1.000.000 por año, (Ramírez et al, 2005).

En Chile, en 1993, se realizó el primer aislamiento de *Acanthamoeba* en una usuaria de lentes de contacto blandas con queratitis bilateral grave, se identificó en el CDC como *A. polyphaga*, (Astorga et al, 1993). En un estudio epidemiológico de caso-control, reveló que el mayor factor de riesgo fue el uso de lentes de contacto, predominantemente los de uso diario o lentes blandas de uso extendido, uso de solución salina hecha en casa en lugar de la solución salina preparada comercialmente (78 y 30% respectivamente). Las lentes blandas son a menudo más reutilizados, lentes de uso diario utilizados durante varios días, lentes de uso mensual utilizados durante varios meses, generalmente, esto ocurre en personas

que los usan sólo ocasionalmente. En Tailandia, un estudio mostró que cerca del 5% de los casos ocurrió en usuarios de lentes de contacto, (Laummaunwai et al, 2011).

Recientes estudios han reportado un significativo aumento en el número de pacientes con QA en los Estados Unidos, Australia, Italia, Nueva Zelanda y Brasil. Hasta el año 2012 habían más de 120 millones de personas usuarias de lentes de contacto en el mundo, (Siddiqui et al, 2012).

La incidencia global de casos de EGA debido a *Acanthamoeba* registrados, fue de 120 casos al año 2000, 84 de estos ocurridos en los Estados Unidos y sobre 50 casos de EGA fueron encontrados en pacientes con SIDA. Al afectar a individuos inmunocomprometidos y con enfermedades crónicas, los casos pueden ocurrir en cualquier época del año, sin un patrón estacional, (Govinda Visvesvara, 2013). Al año 2013 se habían publicado 3 casos de EGA en España, (Magnet et al, 2013). Hay un acuerdo general que EGA y queratitis han aumentado significativamente en los últimos 10 años en los Estados Unidos, por el aumento de los usuarios de lentes de contacto de todas las edades y por el aumento de individuos inmunosuprimidos (Nwachuku et al, 2003). En el 2002, se reportó un caso de meningoencefalitis por *Acanthamoeba* en la India. En 20 años, en Austria, han diagnosticado 3 casos de EGA, identificando los genotipos T2, T4 y T5, (Walochnick et al, 2015).

Primer caso de queratitis por T4 en paciente no usuario lentes contacto y sin historia de trauma ocular en Turquía, (Ertabaklar H. et al, 2007). En Irán, se estudiaron 28 raspados corneales y lentes de contacto de pacientes con queratitis, fueron 14 positivos morfológicamente y 10 por PCR, (Niyiyati et al, 2009). En Valencia, se reportó un caso de queratitis bilateral por *Acanthamoeba*, (Navarro et al, 1998). Queratitis por *Acanthamoeba* asociada al uso de agua potable durante la limpieza de lentes de contacto, (Legarreta et al, 2013). Queropatía por *Acanthamoeba*, tres casos (España), (Güerri et al, 2006). Estudio de 3 casos queratitis por *Acanthamoeba* en Madrid, (Cruz et al, 2004). En España, al año 2013, se habían publicado 24 casos de queratitis, (Magnet et al, 2013). En Filipinas se informó de una QA en paciente no usuario de lente de contacto, (Buerano et al, 2014). Pacientes con queratitis por *Acanthamoeba* en el norte de China (Zhang et al, 2004).

Queratitis por *Acanthamoeba* en no usuario de lentes contacto en India, (Pasricha et al, 2003). Primer reporte de *Acanthamoeba* genotipo T13 en queratitis humana, la paciente fue una mujer de 22 años, del sur de África, usuaria de lentes de contacto blando (Grün et al, 2014). En 20 años, en Austria, se han diagnosticado 154 casos de QA, predominando el genotipo T4, además han encontrado los genotipos T3, T6, T10 y T11, (Walochnik et al, 2015). En otro estudio, se diagnosticaron 14 casos, en el cual además del genotipo T4, se identificó genotipo T15, (Di Cave et al, 2009).

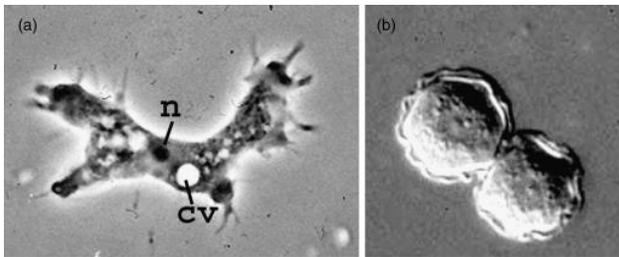
### **3. Morfología**

Trofozoíto: “tropho” en griego significa “para nutrir”, mide de 15 a 45  $\mu\text{m}$ , (Lorenzo-Morales, 2015), es el que se alimenta de partículas orgánicas, bacterias, algas, hongos y detritus presentes en el ambiente. La absorción de los alimentos se realiza mediante fagocitosis o por formación de “copa de alimentos”, que se forman en la superficie de la ameba como estructuras temporales. En el proceso de alimentación participan pseudópodos finos, digitales como espinas llamados acantopodios, la ingestión de líquido es recogido a través de pinocitosis, (Khan et al, 2006). Se reproduce por fisión binaria, (Trabelsi et al, 2012), se divide mitóticamente bajo condiciones óptimas de suministro de alimento, pH neutro y temperatura aproximada de 30°C. Generalmente tiene 1 núcleo vesicular que mide aproximadamente un sexto de la medida del trofozoíto (Khan et al, 2006), de ubicación central, con un nucléolo grande y denso, también se han descrito amebas multinucleadas, cuando *Acanthamoeba* se mantiene en cultivo en suspensión, (Marciano Cabral et al, 2003). El citoplasma es finamente granular y contiene numerosas mitocondrias, ribosomas, lisosomas, vacuolas alimenticias y 1 o más vacuolas contráctiles, cuya función es expulsar el agua para la regulación osmótica, (Nwachuku et al 2003; Visvesvara et al, 2013). *Acanthamoeba* se mueve relativamente rápido, con una velocidad de aproximadamente 0.8 $\mu\text{m}$ /segundo, (Khan et al, 2006). Cuando el alimento llega a ser escaso o cuando se enfrenta a la desecación u otra presión ambiental, la ameba se redondea y enquistada.

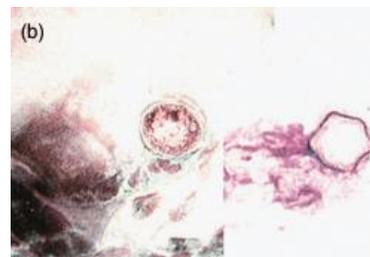
Quiste: tiene una pared con 2 capas, mide entre 5 a 25 $\mu\text{m}$ , (Khan et al, 2006; Visvesvara et al, 2013; Lorenzo Morales et al, 2015). La capa externa o ectoquiste,

tiene pliegues y ondulaciones y está constituida por proteínas, polisacáridos y lípidos, (Khan et al, 2006). La capa interna, el endoquiste, contiene celulosa y por lo tanto, es ácido periódico de Schiff (PAS) positivo. El endoquiste varía en forma, pudiendo ser estrellado, poligonal, oval, triangular o esférico. Ecto y endoplasma están conectados en varios puntos con poros u ostiolas, que están sellados con tapones mucosos, llamados opérculos, que son removidos durante la exquistación. En contraste a infecciones con otras amebas, *Acanthamoeba* puede formar quistes dentro de los tejidos. (Kahn et al, 2006; Lorenzo Morales et al 2015).

**Foto N°14**



**Foto N°15**



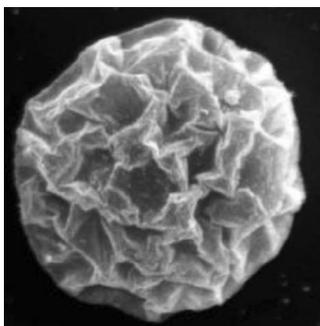
*Acanthamoeba castellanii*

n=núcleo, cv=vacuola contráctil

Quistes en tejido

(Visvesvara G. et al, 2007)

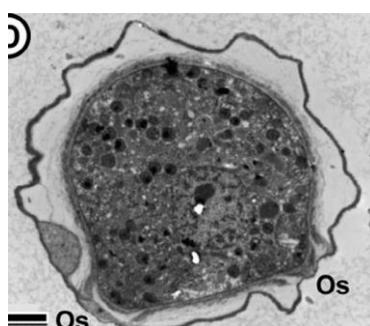
**Foto N°16**



Quiste

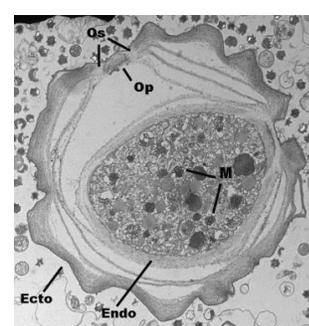
(Fouque et al, 2014)

**Foto N°17**



Quiste con 2 ostiolas

**Foto N°18**



Q. *A. castellanii*\*

(Thomas et al, 2010)

\*Se señala el opérculo, ostiolos, mitocondria, ecto y endoplasma.

**4. Actuación de los desinfectantes:** en un estudio con 3 desinfectantes: cloro, monocloramina y dióxido de cloro, contra 3 AVL: *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Naegleria*, el quiste de *Acanthamoeba* mostró ser más resistente que el trofozoíto y que los quistes de las otras AVL, pero en menor medida con dióxido de cloro, el cual mostró ser el más eficiente en inactivar los quistes, (Dupuy et al, 2013). Estudio de 9 soluciones desinfectante de lentes contra *Acanthamoeba castellanii*, 7 desinfectantes no mostraron efectos amebocidas, sólo 2 desinfectantes exhibieron lisis parcial de trofozoítos en un 85,3% y 73,7%, sólo se evaluaron estos 2 desinfectantes en la forma quística, a los 3 días de cultivo proliferaron los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* indicando la ineficiencia de ambas soluciones de desinfección de lentes de contacto contra los quistes, (Lakhundi et al, 2014).

Los quistes de *Acanthamoeba* spp. tienen mejor supervivencia que los de *Naegleria*, (Gupta et al, 1999), son muy resistentes a la inactivación de desinfectantes del agua, tales como cloro, yodo, bromo, biocidas, etano, luz ultravioleta. El tratamiento con freón, óxido de metileno o tratamiento en autoclave destruye los quistes, (Marciano-Cabral et al, 2003). Las AVL generalmente crecen a T° entre 10 y 30°C. Bajo 4°C sólo sobreviven cepas resistente al frío como *Acanthamoeba polyphaga*, (Cervero-Arajó et al, 2013). Mazur et al 1995, demostraron que 15/17 quistes de amebas se conservaron viables durante más de 24 años después de su almacenamiento en agua a 4°C. También se pudo observar su viabilidad después de mantenerla durante 10 años en criopreservación, (John et al, 2006).

## 5. Diagnóstico de laboratorio

### 5.1 Diagnóstico fenotípico

**5.1.1 Métodos directos:** en muestras clínicas se han aislado de LCR, biopsia y/o raspado de córnea (colocar en 200µl de solución salina estéril, para prevenir la desecación), (Lorenzo-Morales et al, 2015), biopsia de piel, pulmones, cerebro, de hisopos obtenidos de mucosa nasofaríngea de pacientes con problemas respiratorios de individuos infectados, secreción pulmonar. Trofozoítos y quistes se han

encontrado en parénquima pulmonar y lesiones de la piel. Es recomendable que las muestras sean mantenidas a temperatura ambiente hasta su análisis, el que debería hacerse dentro de las 24 hrs. En el análisis del LCR, este se debe centrifugar a baja velocidad (250xg) para evitar la destrucción de los trofozoitos, y la cantidad de LCR debe ser de 3 a 5 ml mínimo para poderlos detectar. El análisis del LCR en general revela pleocitosis linfocítica con leve elevación de las proteínas y glucosa normal o ligeramente disminuida, (Parija et al, 2015). La observación microscópica del LCR puede ser directa sin tinción o empleando tinciones permanentes como: azul de lactofenol en la cual la pared quística y el núcleo se observan en azul intenso, mientras el citoplasma azul tenue, con naranja de acridina, los quistes aparecen naranja brillante en microscopía de fluorescencia. En la tinción de Giemsa o Wright, las amebas presentan un citoplasma retráctil, ligeramente teñido de azul, con un núcleo tenue de color rosáceo, (Lorenzo-Morales et al, 2015). *Acanthamoeba* spp. no se encuentra fácilmente en el líquido cefalorraquídeo, sólo se ha aislado en unos pocos casos. Un caso de *Acanthamoeba* aislada del LCR ocurrió en un paciente sin enfermedad del Sistema Nervioso Central, (Petry F. et al. 2006).

Las biopsias de córnea, tejido cerebral y piel, se fijan en formaldehído y se pueden teñir con hematoxilina eosina, con la que el citoplasma de las amebas se observa azulado y el núcleo púrpura. Otra tinción es la de plata metenamina de Gomori y ácido peryódico de Schiff (PAS). *Acanthamoeba* en tejido ha sido identificada incorrectamente como macrófago u hongo. Calcofluor blanco, es un colorante quimiofluorescente que tiene una afinidad por los polímeros de polisacáridos de los quistes amebianos, ha sido utilizado para identificarlos en el tejido corneal. La tinción blanca de calcofluor en las paredes de los quistes amebianos brillan de color verde manzana, (Marciano-Cabral et al, 2003).

**5.1.2 Método por concentración:** centrifugación de LCR. En muestras de agua y suelo, estas se concentran mediante centrifugación o por filtración en copa.

**5.1.3 Cultivo monoxénico y axénico:** el gold standard para la detección de *Acanthamoeba* es aún la técnica de cultivo en placa, (Lorenzo-Morales et al, 2015). Se cultivan fácilmente con bacterias no mucosas, gran negativa como *Escherichia*

*coli* o *Enterobacter aerogenes*. Las amebas muestran preferencia por bacterias que no son capsuladas o pigmentadas, (Parija et al, 2015), la cápsula mucoide inhibe la fagocitosis por la ameba y las bacterias pigmentadas son a menudo tóxicas. Si el paciente ha sido pre tratado con antibióticos, la densidad de amebas es generalmente muy baja, muestra morfología alterada, incluso el cultivo puede resultar negativo y las técnicas moleculares son indispensables, (Khan et al, 2006; Lorenzo-Morales et al, 2015). Un cultivo positivo de las cajas que almacenan los lentes o soluciones de limpieza no confirman el diagnóstico, sin embargo, sugiere infección con *Acanthamoeba*. Las amebas pueden ser mantenidas indefinidamente en el laboratorio, realizando corte periódico de una pequeña pieza de agar conteniendo trofozoítos o quistes y traspaso a nueva placa con medio ANN. Placas con cultivo moxénico selladas con parafilm pueden ser guardadas por muchos meses a temperatura ambiente, si el medio no se deshidrata, los quistes permanecen viables por muchos años. También se realiza cultivo axénico, el más utilizado es en medio PYG. Algunos investigadores realizan traspaso del cultivo monoxénico de *Acanthamoeba* spp. a cultivo en medio axénico, con el fin de obtener una cepa pura libre de bacterias y realizar la extracción del ADN para realizar metodologías moleculares. Otros medios de cultivo axénicos son el YAS, TYI-S-33, Cerva, entre otros. En cultivo celular se emplean células de mamíferos, HeLA, HEP-2, queratinocitos, VERO, células de riñón de mono, (Marciano-Cabral et al, 2003)

## **5.2 Diagnóstico molecular**

**5.2.1 PCR:** en base a la secuencia del gen rRNA este es usado para comprender la complejidad y filogenia de las especies de *Acanthamoeba*. Estas metodologías aumentan significativamente la sensibilidad del diagnóstico (Lorenzo- Morales et al, 2015). En muestras clínicas se utilizan en LCR, tejido cerebral, piel, córnea y lágrimas. La más utilizada es el PCR tradicional, basados en la diferencia de las secuencias, hasta hoy, 20 genotipos de *Acanthamoeba* han sido establecidos (Tabla N°2). Al comienzo se propuso que entre dos tipos diferentes de secuencias debería existir una divergencia de pares de bases mayor a 5%, (Trabelsi et al, 2012), actualmente esto está siendo evaluado nuevamente dada la expansión de secuencias disponibles, por lo cual se podría reducir a un 4%.

**5.2.2 PCR Tiempo Real y PCR Tiempo Real rápido:** para la detección simultánea de 10 diferentes genotipos de *Acanthamoeba* que puede detectar 0.1 quiste por  $\mu\text{l}$ , (Siddiqui et al, 2012). La mayoría de las infecciones humanas debido a *Acanthamoeba* han sido asociadas con los aislados del genotipo T4, (Trabelsi et al, 2012). No está claro porqué el aislado T4 es el más abundante en infecciones humanas, pero es probable que sea debido a su mayor virulencia y propiedades que mejoran su transmisibilidad, así como la susceptibilidad reducida a los agentes quimioterapéuticos. Inicialmente hubo una subclasificación de T4 en 10 subgrupos (T4/1 a T4/10), posteriormente se amplió a 21 y luego a 23, (Maciver et al, 2013).

**5.2.3 PCR múltiple de Tiempo Real:** para *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri*. (Qvarnstrom Y. et al, 2006).

**5.3 Diagnóstico indirecto:** se ha utilizado inmunofluorescencia, ELISA, citometría de flujo, (Parija et al, 2015). Por inmunofluorescencia, individuos infectados con *Acanthamoeba* presentan niveles de anticuerpo en títulos que van desde 1:256 a 1:1024 en suero, mientras que individuos sin infección presentan títulos de anticuerpos que no pasan de 1:80, (Da Rocha-Azevedo et al, 2009). Se ha encontrado un 100 % de anticuerpos anti *Acanthamoeba* en población sana en Nueva Zelanda y más del 85% en individuos en Londres que vienen desde diferentes países, (Siddiqui et al, 2012). Se ha descrito seroprevalencia de anticuerpos anti *Acanthamoeba* en pacientes con artritis reumatoide por inmunofluorescencia en Tehran, Iran, (Eftekhari et al, 2010). En otro estudio en hispanos se encontró que tenían 14,5 veces menos de probabilidades de desarrollar anticuerpos para *Acanthamoeba*, especialmente *A. polyphaga*, que los caucásicos, (Visvesvara Govinda, 2013).

## **6. Diagnóstico por imágenes**

Imágenes de tomografía computarizada o resonancia magnética han sido realizadas en algunos pacientes con meningoencefalitis granulomatosa. La tomografía

computarizada de cerebro (TAC) muestra múltiples lesiones grandes de densidad baja que simulan una masa única o múltiple. La resonancia nuclear magnética con contraste muestra múltiples lesiones anular en el cerebro o lesiones discretas sugestivas de abscesos o tumores cerebrales, (Marciano-Cabral et al, 2003; Lorenzo-Morales et al, 2011).

En la Tabla N°2 se presentan los genotipos T1 al T20, la especie relacionada a cada genotipo, número en la base de cepas de la ATCC, el número de acceso al GenBank y la referencia bibliográfica de la publicación de cada genotipo.

**TABLA N°2**

**INFORMACIÓN GENOTIPOS T1 - T20 DE *Acanthamoeba* spp.**

<b>Genotipo</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa ATCC</b>	<b>N° Acceso GenBank</b>	<b>Referencias</b>
<b>T1</b>	<i>A. castellanii</i>	50494	U07400	Gast R.J. et al ,1996
<b>T2</b>	<i>A. palestinensis</i>	30870	U07411	Gast R.J. et al, 1996
<b>T3</b>	<i>A. griffini</i>	30731	U07413	Gast R.J. et al, 1996
<b>T4</b>	<i>A. castellanii</i>	30011	U07413	Gast R.J. et al, 1996
<b>T5</b>	<i>A. lenticulata</i>	50428	U94739	Stothard D. et al, 1998
<b>T6</b>	<i>A. palestinensis</i>	50708	AF019064	Stothard D. et al,1998
<b>T7</b>	<i>A. astronyxis</i>	30137	AF019063	Stothard D. et al, 1998
<b>T8</b>	<i>A. tubiashi</i>	30867	AF019065	Stothard D. et al, 1998
<b>T9</b>	<i>A. comandoni</i>	30135	AF019066	Stothard D. et al, 1998
<b>T10</b>	<i>A. culbertsoni</i>	30171	AF019067	Stothard D. et al, 1998
<b>T11</b>	<i>A. hatchetti</i>	30730	AF019068	Stothard D. et al, 1998
<b>T12</b>	<i>A. healyi</i>	30866	AF019070	Stothard D. et al, 1998
<b>T13</b>	UWC9	PARA-3	AF132134	Horn M. et al, 1999
<b>T14</b>	PN13 – UWE39	Sin dato	AF333609	Horn M. et al, 1999
<b>T15</b>	<i>A. jacobsi</i>	30732	AY262360	Hewett M. et al, 2003
<b>T16</b>	U/HC1	Sin dato	AY026245	Corsaro D., et al., 2010
<b>T17</b>	Ac E1a	Sin dato	GU808277	Nuprasert W., et al, 2010
<b>T18</b>	<i>A. byersi</i>	Sin dato	KC822461	Qvarnstrom Y. et al, 2013
<b>T19</b>	<i>A. micheli</i> sp.nov.	Sin dato	KJ413084	Magnet et al, 2014
<b>T20</b>	OSU 04-020	Sin dato	DQ451161	Fuerst P.A. et al, 2015

OSU (Ohio State University) <https://u.osu.edu/acanthamoeba/>

## 7. Patogénesis

La patogénesis de *Acanthamoeba* está relacionada a factores directos e indirectos.

**7.1 Factores directos de virulencia** son los mecanismos dependientes de contacto como la adhesión, fagocitosis y mecanismos independientes de contacto como las proteasas. (Lorenzo-Morales et al, 2015).

**7.1.1 Adhesión:** el primer paso crítico en la patogénesis de la infección es la adhesión del parásito a la superficie de los tejidos del hospedero. En muchos casos, las interacciones iniciales entre el parásito y el anfitrión están mediadas por un sistema de reconocimiento mediado por hidratos de carbono. La superficie de todas las células eucariotas tiene glicoproteínas, que están constituidas de oligosacáridos unidas a un eje de la proteína. Las cadenas de oligosacáridos están constituidos por una serie de azúcares, incluyendo hexosas (por ejemplo, manosa y galactosa), pentosas (por ejemplo. fucosa), hexosaminas (por ejemplo, la glucosamina y galactosamina) y ácidos siálicos. Estudios actuales han confirmado que la unión de *Acanthamoeba* a las células hospederas es mediada por Proteínas de Unión a Manosa (PUM) de 130 kDa expresada en la superficie de *Acanthamoeba*, que ofrecen eventos secundarios, tales como fagocitosis, apoptosis y secreción de proteasas extracelulares, las cuales juegan un rol causando daño celular y tisular al hospedador (Lorenzo-Morales et al, 2005; Panjwani et al, 2010).

**7.1.2 Fagocitosis:** La adhesión de *Acanthamoeba* conduce a procesos secundarios tales como la fagocitosis o la secreción de toxinas. La función principal de la fagocitosis de *Acanthamoeba* es tomar las partículas de alimentos. Sin embargo, la capacidad de *Acanthamoeba* para formar copas de alimentos o amebostomas durante incubaciones con las células hospedadoras sugiere que tiene un papel en la patogénesis de la *Acanthamoeba*, dentro de 40 segundos, las partículas unidas están rodeadas de pseudópodos, puestas en el citoplasma, y liberadas como fagosoma en la corriente citoplasmática.

**7.1.3 Proteasas:** son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total de proteínas. *Acanthamoeba* se muestra expuesta a las actividades proteolíticas. La

función principal de las proteasas de *Acanthamoeba* es degradar sustancias alimenticias con fines de alimentación.

Las actividades de la neuraminidasa de *Acanthamoeba* podrían ser relevantes en la colonización del parásito y también son importante en la producción de daños en el ácido siálico del epitelio de la córnea y en las alteraciones de glicolípidos asociados con meningoencefalitis. Curiosamente, las neuraminidasas de *Trypanosoma cruzi* y *Acanthamoeba* son inmunológicamente relacionados como se ha demostrado por anticuerpos contra neuraminidasas de *Trypanosoma cruzi*, los cuales reaccionan con *Acanthamoeba*, (Lorenzo-Morales et al, 2015).

**7.2 Factores indirectos de virulencia:** características morfológicas, tolerancias fisiológicas como la osmotolerancia, termotolerancia, diferenciación celular, quimiotaxis, ubicuidad, biofilms y factores del hospedador.

**7.2.1 Características morfológicas:** las formas infecciosas de *Acanthamoeba* o trofozoítos no tienen una morfología distinta. Sin embargo, ellos poseen estructuras conocidas como acantopodio en su superficie, lo que les permite modular la unión de *Acanthamoeba* a superficies biológicas e inertes.

**7.2.2 Termotolerancia y osmotolerancia y crecimiento a diferente pH:** la capacidad de *Acanthamoeba* de crecer a altas temperaturas y alta osmolaridad pueden proporcionar un buen indicador del potencial patógeno de un aislado. Los mecanismos precisos por los cuales la patógena *Acanthamoeba* se adapta a temperaturas más altas y mantiene sus actividades metabólicas requiere de estudios adicionales.

**7.2.3 Diferenciación celular:** es la capacidad de *Acanthamoeba* de diferenciarse en formas diferentes, de forma quística latente a forma vegetativa, el trofozoíto. Este es un cambio reversible dependiente de las condiciones ambientales.

**7.2.4 Quimiotaxis:** dirige el movimiento de la ameba de acuerdo a la presencia de ciertos compuestos químicos en su ambiente. Esto es importante ya que *Acanthamoeba* se mueve hacia la mayor concentración de moléculas de alimentos, o para huir de las sustancias tóxicas.

**7.2.5 Ubicuidad:** *Acanthamoeba* se ha encontrado en diversos ambientes, todo tipo de aguas, suelos, incluso en lugares extremos como la Antártica.

**7.2.6 Formación de biofilms:** juegan un importante rol en la patogénesis de QA. Son derivados microbianos de comunidades sésiles, que se pueden formar en ambientes acuosos, así como en cualquier material y dispositivos médicos, incluyendo catéteres intravenosos, lentes de contacto, material de sutura, y lentes intraoculares. Una vez establecidos, los biofilms son conocidos como reservorios de un gran número de microorganismos que proveen a los parásitos un atractivo nicho y una abundancia de nutrientes, los que proporcionan resistencia a los desinfectantes. Ellos juegan un importante rol en la patogénesis de *Acanthamoeba*, particularmente, en queratitis, la prevención en la formación de biofilms es quizás una importante estrategia de prevención, (Trabelsi et al, 2012).

**7.2.7 Factores del hospedador:** los factores que permiten a *Acanthamoeba* producir enfermedad no se limitan únicamente al patógeno, lo más probable es que implique determinantes del hospedador. La evidencia de esto proviene de estudios recientes en el Reino Unido, Japón y Nueva Zelanda, que sugieren que las cajas de almacenamiento de lentes de contacto son 400 a 800 veces por cada 10.000 portadores asintomáticos contaminadas con *Acanthamoeba*. Este número es muy alto en comparación con la tasa de incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto, que es de alrededor de 0,01-1,49 por 10.000. Estos hallazgos sugieren que factores tales como la susceptibilidad del hospedero, la especificidad tisular, características de las lágrimas, IgA, trauma de la córnea, así como los factores ambientales tales como la osmolaridad pueden ser importante en la iniciación de la infección de *Acanthamoeba*, (Lorenzo-Morales et al, 2015).

**8. Inmunorespuesta a infección por *Acanthamoeba*:** directamente activa el sistema del complemento por la vía alterna, sin embargo, amebas patógenas son resistentes a la lisis mediada por el complemento debido a la expresión de las proteínas reguladoras del complemento. La vía del complemento y los anticuerpos en presencia de los fagocitos muestran una potente actividad lítica contra *Acanthamoeba* de una manera dependiente del contacto. Estas interacciones

también estimulan la secreción de citoquinas proinflamatorias incluyendo interleukinas-1-beta, interleukinas-6 y factor de necrosis tumoral-alfa, (Siddiqui et al, 2012).

## **9. Aspectos clínicos**

De los 20 genotipos de *Acanthamoeba* spp. descritos hasta aquí, 12 han sido aislados en casos humanos, 4 sólo en queratitis (genotipos T3, T6, T11 y T13), 3 sólo en encefalitis (genotipos T1, T12 y T18) y 5 genotipos identificados en casos de queratitis y encefalitis ( genotipos T2, T4, T5, T10 y T15).

En la Tabla N°3 se presentan estos datos, en la mayoría de los casos con la especie involucrada y en el Grupo de Pussard y Pons que fueron incorporadas. (Khan et al, 2006; Corsaro et al, 2010; Nuparasert et al, 2010; Qvarnstrom et al, 2013; Magnet et al, 2014; Fuerst et al, 2015).

**TABLA N° 3**

**GENOTIPOS, ESPECIES, ENFERMEDAD Y GRUPOS PUSSARD Y PONS**

Genotipo	Enfermedad	Especie	Grupo Pussard
T1	Encefalitis	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Grupo III
T2	Queratitis, encefalitis	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	Grupo III
T3	Queratitis	<i>Acanthamoeba griffini</i>	Grupo II
T4	Queratitis, encefalitis	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Grupo II
T5	Queratitis, encefalitis	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	Grupo III
T6	Queratitis	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	Grupo III
T7	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	Grupo I
T8	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba tubiaschi</i>	Grupo I
T9	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba comandoni</i>	Grupo I
T10	Queratitis, encefalitis	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	Grupo III
T11	Queratitis	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	Grupo II
T12	Encefalitis	<i>Acanthamoeba healyi</i>	Grupo III
T13	Queratitis	<i>Acanthamoeba</i> spp. (Grün A-L et al, 2014)	Grupo II
T14	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp.	No establecido
T15	Encefalitis-queratitis	<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	Grupo III
T16	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp (Aislada en muestra clínica de perro)	Grupo II
T17	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp	Grupo I
T18	Encefalitis	<i>Acanthamoeba byersi</i>	Grupo I
T19	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba micheli</i> sp. Nov	Grupo II
T20	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp	Grupo III

**9.1 *Acanthamoeba* cutánea:** en pacientes inmunocomprometidos la piel también es considerada como puerta de entrada de *Acanthamoeba*, ellas pueden entrar en el cuerpo a través de heridas en la piel, dando lugar a la diseminación hematológica a los pulmones y al cerebro, la infección generalmente comienza como un nódulo único que se extiende, ulcera y se disemina en semanas a meses y más tarde podría involucrar el SNC, (Marciano-Cabral et al, 2003). Las lesiones en la piel generalmente involucran la cara, tronco y extremidades, tienen un diámetro entre 0,1 a 3,0 cm, se presentan como nódulos, pápulas o pústulas. La infección puede o no diseminarse, la acanthamebiasis diseminada es casi universalmente fatal. En individuos sanos esta infección es rara y autolimitada. El diagnóstico y tratamiento temprano de lesiones en la piel son esenciales por la naturaleza fatal de la enfermedad diseminada, (Khan et al 2006).

Los factores de riesgo de la infección en la piel por *Acanthamoeba* incluyen zonas traumatizadas como cicatrices quirúrgicas, lesiones de la varicela zóster concurrentes, picaduras, y trauma mecánico, (Walia et al, 2006). Esta infección puede preceder a la Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) por varias semanas o meses o ser independiente una de otra, (Khan et al, 2006). El rango de mortalidad involucrada de infección cutánea para individuos sin compromiso del SNC es aproximadamente 73%, mientras que infección cutánea acompañada de enfermedad del SNC es 100%.

**Foto N°19**



**Foto N°20**



Acanthamebiasis cutánea, casos Peruanos, (Galarza y col, 2006)

En el Perú, en el 2006, se reportaron lesiones cutáneas por *Acanthamoeba* en 4 casos, (Galarza C. et al, 2006). En otra publicación se describieron lesiones en la extremidad inferior y dispersas en el tronco como nódulos eritematosos que van desde 0,5 a 3,0 cm de diámetro, en un paciente trasplantado de pulmón con infección cutánea por *Acanthamoeba* que fueron tratadas exitosamente con el complejo lipídico de anfotericina B y voriconazol, ambos intravenosos, (Walia et al, 2006).

**9.2 Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA):** descrita en los años 60 como una enfermedad oportunista y es la segunda infección asociada con *Acanthamoeba*. El acceso al SNC puede ser por diseminación hematógena desde un sitio primario en los pulmones o la piel o directamente a través del neuroepitelio olfatorio, (Marciano-Cabral et al, 2003; Khan et al, 2006). EGA es ahora reconocida como una enfermedad que ocurre más a menudo en gente con sistema inmune debilitado u otro problema de salud debilitada. Factores predominantes incluyen; condiciones autoinmunes, diálisis, diabetes, insuficiencia renal, cirrosis, tuberculosis, úlceras de la piel, enfermedad de Hodgkin, terapia con radiación, alcoholismo, embarazo, fumadores o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, (Visvesvara et al, 2013). Los factores predisponentes incluyen alcoholismo, abuso de drogas, el tratamiento con corticoides, quimioterapia, radioterapia, cáncer, y trasplante de órganos, (Marciano-Cabral et al, 2003). Recientemente, ha aumentado el número de casos y han sido descritos en niños y adultos inmunocompetentes (Kahnna et al, 2014), los casos de EGA por *Acanthamoeba* pueden ocurrir en cualquier época del año, (Visvesvara Govinda, 2013).

Los casos de EGA son comúnmente mal diagnosticados, los signos clínicos no son específicos, por lo tanto, la enfermedad se diagnostica a menudo como leptomeningitis bacteriana, meningitis tuberculosa, encefalitis viral, toxoplasmosis, infección por hongo, neurocisticercosis, o tumor cerebral. Alto índice de sospecha por los clínicos y expertos de laboratorio es requerido para detectar esta infección potencialmente mortal y comenzar una terapia apropiada. Muchas especies de *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* y *A. divionensis*), (Nwachuku et al, 2003), han sido conocidas como causantes de

EGA. El comienzo es lento e insidioso y se desarrolla como una enfermedad crónica que abarca desde varias semanas a meses. La característica usual consiste en dolor de cabeza, fiebre, rigidez en el cuello, estado mental anormal, náuseas, vómitos, febrículas, letargo, ataxia cerebral, diplopia, hemiparesis, convulsiones, disminuidos los niveles de conciencia y coma. Parálisis de nervios craneales, signos meníngeos, o hemiparesia pueden ser vistos en el examen físico. En la causa de muerte generalmente se incrementa la presión intracraneal con herniación cerebral, lo que lleva a un paro cardio pulmonar y edema pulmonar, (Da Rocha-Azevedo et al, 2009; Visvesvara Govinda, 2013).

En pacientes con infecciones no queratitis por *Acanthamoeba*, también predomina el genotipo T4, en un estudio en 29 casos, se identificaron 23 genotipo T4, 3 genotipos T3, 2 genotipos T10 y 1 genotipo T12, (Booton et al, 2005). EGA con frecuencia se disemina en piel, pulmones, tráquea, riñones, hígado, glándulas suprarrenales, páncrea, próstata, nódulos linfáticos, médula ósea y tiroides, (Marciano-Cabral et al, 2003). También se ha descrito un caso de una acanthamebiasis diseminada en un receptor de trasplante renal, (Steinberg J.P. et al, 2002). En pulmón, trofozoítos y quistes han sido encontrados en alvéolo pulmonar de individuos infectados y neumonitis es un rasgo característico. Se describió un caso de un paciente que estaba en diálisis y encontraron *Acanthamoeba* spp. en el líquido peritoneal, (Tilak R et al., 2008). Otro caso fue el hallazgo de amebas patógenas como agente causal emergente de neumonía, (Lamoth F. et al, 2010). *Acanthamoeba lenticulata*, genotipo T5, fue aislada en trasplantado cardíaco, el paciente con acanthamebiasis diseminada involucró piel, hueso, pulmones, órganos intraabdominales y representó el primer caso en un receptor de trasplante al corazón. La primera biopsia fue diagnosticada falsamente negativa, los trofozoítos habían sido erróneamente identificados como histiocitos, una segunda muestra de biopsia mostró quistes y trofozoítos de amebas, (Barete S. et al, 2007).

**9.3 Infección en paciente con SIDA:** El primer caso reportado de infección de *Acanthamoeba* en paciente con SIDA fue en 1986. Un aumento en el número de casos de infección diseminada por *Acanthamoeba* ha sido publicado en estos pacientes. Tales individuos suelen exhibir enfermedad avanzada por VIH con un

recuento bajo de células T CD4<sup>+</sup> (menos de 200/mm<sup>3</sup>). La mayoría de los pacientes muere 1 mes después del comienzo de los síntomas neurológicos. Las lesiones en la piel son la presentación más a menudo de la infección de *Acanthamoeba* en estos pacientes, (Marciano-Cabral et al, 2003). Además, se sabe que los pacientes con VIH / SIDA tienen sinusitis crónica, otitis, úlceras y/o abscesos en las fosas nasales, y/o nódulos eritomatosos en el cuerpo y extremidades, (Visvesvara Govinda, 2013).

**9.4 Queratitis por *Acanthamoeba*:** es una dolorosa amenaza de la visión causada por infección de esta ameba. Los factores de riesgo son un proceso multifactorial que involucra el uso de lentes de contacto por períodos prolongados de tiempo, limpieza inadecuado de las lentes de contacto y de las cajas que las almacenan, la formación de biofilms en lentes de contacto, la exposición al agua contaminada, (Siddiqui et al, 2012), frotarse los ojos, trabajar con suelo, uso de solución salina hecha en casa para limpiar los lentes de contacto, manejo de lentes de contacto con manos sucias, reuso de lentes de contacto sin limpieza apropiada, incubación de lentes de contacto en desinfectantes por menos tiempo que el recomendado, desinfectantes basados en cloro son menos efectivos en matar a *Acanthamoeba*, uso de agua potable, uso de agua embotellada, uso de soluciones no estériles, uso de saliva para humedecer las lentes, uso de lentes en la natación, en baños de hidromasaje y en termas. En países desarrollados, la infección de queratitis por *Acanthamoeba* generalmente no está asociada con usuarios de lentes de contacto, por lo contrario, la mayoría de los casos son el resultado de trauma ocular. En la India el trauma corneal es la causa usual de QA, (Nwachuku et al, 2003; Khan et al, 2006; Siddiqui et al, 2012).

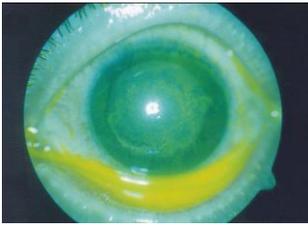
El diagnóstico de QA es problemático y es a menudo mal diagnosticado como queratitis bacteriana, viral o micótica. En la primera etapa del diagnóstico, puede ser fácilmente confundido con queratitis por *Herpes simplex*, (Lorenzo-Morales et al, 2015), mientras que en la etapa avanzada, la infección se parece al cuadro clínico de una queratitis micótica o una úlcera corneal. El paso más importante en el diagnóstico de QA es pensar en ello, (Lorenzo-Morales et al, 20015). Generalmente, la QA debe considerarse en todos los usuarios de lentes de contacto y en algunos casos de trauma corneal con exposición a suelo o agua contaminada. Una úlcera corneal que no sana es a menudo el primer indicio de que QA puede ser el

problema. Si el diagnóstico se retrasa, las amebas ya han penetrado profundamente en el estroma de la córnea y la terapia con éxito es extremadamente difícil. QA es generalmente unilateral, sin embargo, queratitis bilateral también ha sido reportada, QA se caracteriza por inflamación de la córnea, severo dolor ocular y fotofobia. El cuadro progresa lentamente, desde epitelial a la enfermedad estromal. La característica clínica más relevante de QA es la presencia de un infiltrado estromal de anillo. El infiltrado característico en anillo sólo se ve en aproximadamente el 50% de los pacientes, (Lorenzo-Morales, 2015). Los trofozoítos pueden infiltrarse en los nervios de la córnea, causando neuritis y necrosis. En raras circunstancias, *Acanthamoeba* puede propagarse de la córnea a la retina, causando coriorretinitis, (Marciano-Cabral, et al, 2003). Al comienzo de la infección, se encuentra una queratopatía superficial difusa, más tarde los infiltrados multifocales son casi siempre observados en el estroma. *Acanthamoeba* escleroqueratitis es una complicación poco común de QA y presuntamente tiene un origen inmune, (Lorenzo-Morales et al, 2015).

El uso in vivo de microscopía confocal ha emergido como una valiosa herramienta no invasiva para el diagnóstico clínico en queratitis infecciosa severa, con alta sensibilidad. Si la infección no se trata rápida, oportuna y agresivamente, puede conducir a la ulceración de la córnea, pérdida de la agudeza visual y eventualmente ceguera y enucleación. Diferente a EGA esto ocurre en individuos inmunocompetentes, sin embargo, estos individuos no desarrollan inmunidad protectora y pueden ocurrir reinfecciones. Ningún caso de EGA ha sido informado de haberse desarrollado de un caso de QA, aunque un caso de uveítis fue asociado con una fatal EGA, (Lorenzo-Morales et al, 2015).

La mayoría de los casos de QA son causados por el Grupo II de Pussard, aunque cepas del grupo III también han sido descritas como agentes causales de QA, (Lorenzo-Morales et al, 2015).

## Foto N°21



Queratitis por *Acanthamoeba*, primer caso en Paraguay. Tinción con fluoresceína (biomicroscopía), que evidencia una queratopatía punteada superficial con tendencia a un patrón anular, (Ramírez L. et al, 2005).

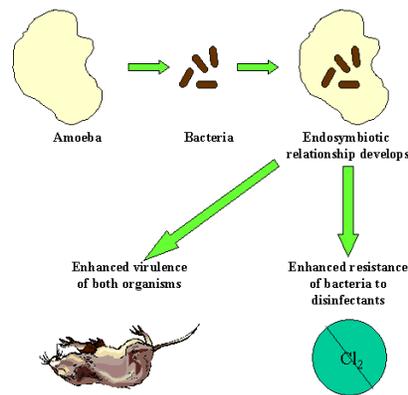
En resumen, en el caso de queratitis, una vez introducida la ameba en el ojo, esta se adhiere a la superficie corneal, secreta enzimas proteolítica y colagenolítica que pueden dañar el epitelio corneal y así contribuir a la patogenicidad de QA. Estudios recientes indican que el proceso inicial de la invasión se produce cuando la PUM, una lectina, expresada en la superficie de *Acanthamoeba*, se adhiere a las glicoproteínas de manosa en la superficie de la célula epitelial y la destruye. Una vez conectado, las amebas se infiltran en el estroma y causan necrosis tisular. En el infiltrado de células inflamatorias se encuentran leucocitos polimorfonucleares en las capas superficial y media del estroma corneal. La secuencia de eventos en queratitis por *Acanthamoeba* implica ruptura de la barrera epitelial, invasión del estroma por amebas, el agotamiento de queratocitos, la inducción de una respuesta inflamatoria intensa, fotofobia y finalmente necrosis estromal con consecuencias que pueden causar ceguera, (Siddiqui et al, 2012; Visvesvara Govinda, 2013).

**10. Endosimbiosis:** la primera vez que se mostró a *Acanthamoeba* estar infectada con bacterias fue en el año 1954 y en 1975 se demostró que albergaba bacterias como endosimbiontes, (Khan et al, 2006). *Acanthamoeba* puede jugar un rol significativo en la transmisión de algunas bacterias en agua potable, especialmente de algunas bacterias patógenas al servir como hospederos de ellas, siendo descrita como “Caballo de Troya”. La localización intracelular de estos microorganismos protegidos de condiciones adversas, le permite además a las bacterias evadir las defensas del hospedero, resistir la acción de los antibióticos y aumentar su virulencia, (Trabelsi et al, 2012). Se describió que aproximadamente del 20 al 24%

de los aislados de *Acanthamoeba* clínicos y ambientales albergan bacterias intracelularmente, (Visvesvara et al, 2013).

**Figura N°3.** Caballo de Troya (*Acanthamoeba* spp.-*Balamuthia mandrillaris*)

(Nwachuku et al, 2003)



*Acanthamoeba* se alimenta de bacterias en el ambiente, capturándolas dentro de su citoplasma mediante la fagocitosis. Las bacterias fagocitadas son usualmente muertas y digeridas por la ameba, sin embargo, algunas especies de bacterias pueden crecer y reproducirse dentro del citoplasma y llegar a ser simbiote, (Nwachuku et al, 2003). La mayoría de las *Acanthamoeba* spp. hospedan endosimbiontes que pueden incluir, virus, hongos, protistas y bacterias, algunas de las cuales son potencialmente patógenas para el ser humano. Además puede aumentar la virulencia de algunas bacterias llamadas Microorganismos Resistentes a Amebas (MsRA), (Coşkun et al, 2013). Rowbotham, en 1980, publica el primer reporte de asociación de las amebas *Naegleria* y *Acanthamoeba* con los simbiotes *Legionella pneumophila*, la cual tiene la capacidad de reproducirse en el interior del trofozoíto. Se ha propuesto que puede ser importante en la persistencia y dispersión de este organismo en el ambiente y que sería más virulenta después de una permanencia en *Acanthamoeba*, también se ha sugerido que algunas bacterias que habitan dentro de la ameba son protegidas de los desinfectantes que son usados en

las plantas de tratamiento del agua y sobrevivir, lo que podría plantear un problema de salud pública. Autores han mostrado que el crecimiento de *L. pneumophila* en agua potable ocurre solamente en presencia de amebas y puede permanecer en cultivo sobre 6 meses en un medio con *Acanthamoeba castellanii*. Las *Acanthamoeba* encontradas como hospedero de *Legionella* spp intracelular son: *A. castellani*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis*, *A. royreba*.

*Acanthamoeba* es conocida por hospedar una variedad de virus: Mimivirus, coxsackievirus, adenovirus, poliovirus, ecovirus, enterovirus o virus vesicular estomatitis. Levaduras como *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, y *Exophiala dermatitidis*. Entre las bacterias patógenas están: *Aeromonas* spp, *Bacillus cereus*, *Bartonella* spp, *Burkholderia* spp, *Burkholderia pickettii*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burnetti*, *Escherichia coli* 0157, neuropathogenic *Escherichia coli* K1, *Flavobacterium* spp, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, *Pastereulla multocida*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromona gingivalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Rickettsia*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Waddlia chondrophila*, (Winięcka-Krusnell J. et al, 2002; Nwachuku et al, 2003; Khan et al, 2006; Lau. et al, 2009; Visvesvara et al, 2009; Shanan S. et al, 2011; Trabelsi et al, 2012; Siddiqui et al, 2012; Coşkun et al, 2013; Visvesvara Govinda, 2013; Wheat W. H. et al, 2014; Goñi et al, 2014).

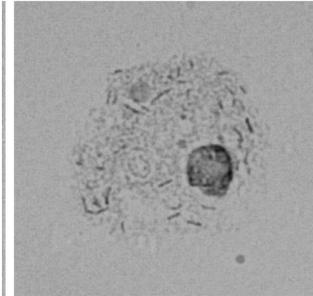
Entre los protistas están *Cryptosporidium* y *Toxoplasma gondii*.

En *Cryptosporidium* spp el estudio consistió en cultivo de *Acanthamoeba* sp. Grupo II en presencia de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. En *Acanthamoeba* encontraron un máximo de 3 ooquistes por trofozoíto, promedio 1. Los autores dicen que los trofozoítos de las amebas pueden hospedar temporalmente *Cryptosporidium* y pueden actuar como transporte pero no proliferar y además pueden jugar un rol importante en la transmisión, (Scheid, et al, 2011). Con *Toxoplasma gondii* se

demostró la supervivencia por más de 2 semanas en *Acanthamoeba castellanii*, sin reducir la infectividad y la patogenicidad del ooquiste, (Winiiecka-Krusnell et al, 2009).

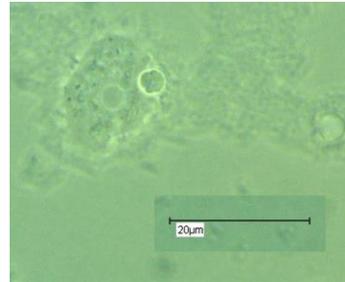
Imágenes de endosimbiosis de *Acanthamoeba* spp con bacterias y *Cryptosporidium* spp.

**Foto N°22**



SeonHee Choi et al, 2009

**Foto N°23**



Scheid et al, 2011

En un estudio realizado con algunas bacterias patógenas oportunistas de brotes de origen alimentario en presencia de *A. polyphaga* (genotipo T4), los resultados confirmaron la capacidad de las bacterias evaluadas de crecer dentro de la ameba hospedera, observándose 2 tipos de interacción. El 1º caracterizado por una temprana replicación, probablemente seguido por la muerte y digestión de la bacteria. El 2º tipo, caracterizado por la persistencia y crecimiento dentro del hospedero sin lisis, el recuento extracelular mostró aumento de estas últimas bacterias. El estudio sugiere ser potencialmente diseminador en el medio ambiente, destacando el posible rol de este protozoo en contaminación alimentaria, (Anacarso I. et al, 2011).

## 11. Tratamiento

**11.1 Terapia de infección cutánea:** tratamiento exitoso se ha logrado en infecciones cutáneas por *Acanthamoeba* spp, sin involucrar el SNC, el tratamiento se ha realizado con una combinación de isotienato de pentamidina, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol o itraconazol. Aplicaciones tópicas de gluconato de clorhexidina y crema de ketonazol. Resultado exitoso se logró utilizando 40 mg de 5-

fluocitosina por kg durante 2 semanas en un paciente con SIDA, lesiones cutáneas y de los senos paranasales, (Marciano-Cabral et al, 2003).

**11.2 Terapia en EGA:** no hay tratamiento específico y la mayoría de los casos son diagnosticados post mortem. Los pocos casos exitosos involucraron el uso de ketoconazol, fluconazol, sulfadiaina, pentamidina isetionato, amfotericina B, azithromicina, itraconazol or rifampicina pero en general el pronóstico sigue siendo pobre. Otra droga, miltefosina, ha sido exitosamente usada en tratamiento de un paciente con EGA en Austria. Tratamiento con combinación de drogas que incluyen, pentamidina, fluconazol, 5 fluocitosina y sulfadiazina se han obtenido resultados exitosos y los pacientes han sobrevivido. En muchos casos, sin embargo, la terapia fue discontinuada debido a efectos secundarios indeseables de la medicación, (Visvesvara Govinda, 2013).

**11.3 Infección diseminada** por *Acanthamoeba* con compromiso del SNC, ha sido satisfactoriamente tratada con combinación isetionato de pentamidina, hidroxistilbamidina, polimixina, paromomicina, 5-fluorocitosina, sulfadiazina, trimetoprim-sulfametoxazol, azitromicina, flucitosine and fluconazol, itraconazole, ketoconazol y extractos de plantas medicinales, (Marciano-Cabral et al, 2003; Walia et al, 2007; Visvesvara G. et al, 2007; Lorenzo-Morales et al, 2011; Siddiqui et al, 2012).

**11.4 Terapia de Queratitis:** una variedad de drogas se han utilizado incluyendo clorhexidina, polihexametileno biguanida (PHMB), o clorhexidina digluconato, polyhexametileno biguanida, isetionato propamidina (Brolene), isetionato dibromopropamidina, hexamidina, neomicina, paromomicina, polimixina B, clotrimazol, ketoconazol, miconazol e itraconazol, (Nwachuku et al, 2003; Ramírez et al, 2005). Isetionato de dibromopropamidina se han encontrado ser efectiva en el tratamiento de infección por *Acanthamoeba* sin embargo puede presentar toxicidad y desarrollar resistencia, (Visvesvara et al, 2007). Un reporte de tratamiento exitoso en QA fue usando 0,1% de Brolene tópicamente con 0,15 dibromopropamidina. Tratamiento tópico con miconazol, sin embargo, ha llevado a toxicidad epitelial, (Marciano-Cabral et al, 2003). También se ha aplicado Polihexametileno biguanida

(PHMB), o clorhexidina gluconato con o sin Brolene. Un un paciente con QA usuario de lentes de contacto blando, fue tratado con tobramicina (Tobradex), Brolene y povidona yodada (Betadine), (Lorenzo-Morales J. et al, 2007; Lorenzo-Morales et al, 2011; Siddiqui et al, 2012; Visvesvara G. et al 2013).

**12. Prevención:** educación a los pacientes en los cuidados adecuados en el uso de los lentes de contacto. En la limpieza meticulosa en el almacenamiento de ellos, en seguir las recomendaciones de uso de los fabricantes y de los oftalmólogos, en no usar los lentes durante la natación, en deportes acuáticos, en jacuzzi, entre otros. Una solución al 3% de peróxido de hidrógeno se ha utilizado para la desinfección de lentes de contacto y cajas de los lentes ya que se ha demostrado su actividad contra los quistes y trofozoítos. Se ha recomendado que se utilice un sistema de peróxido de hidrógeno de dos pasos a concentraciones de 3% en lugar del 0,6% ya que las bacterias presentes en las cajas de los lentes producen catalasa, que neutraliza el peróxido, (Marciano-Cabral et al, 2003; Visvesvara Govinda, 2013).

**13. Infección en animales:** *Acanthamoeba* spp. también causa infección del SNC de animales, incluyendo gorilas, monos, perros, conejos, bovinos, caballos y canguros, así como palomas, pavos, tucán, reptiles, anfibios, peces e incluso invertebrados, (Siddiqui et al, 2012; Visvesvara Govinda, 2013; Carlesso et al, 2014; Grün et al, 2014). Una *Acanthamoeba* fue aislada del hígado de un tucán y creció a 44°C, fue identificada como genotipo T4, (Visvesvara et al, 2007). Estos estudios, basados sobre la secuencia de la subunidad pequeña del gen rRNA, ha mostrado que varios aislados de *Acanthamoeba* de pescado, reptiles y aquellos asociados con queratitis por *Acanthamoeba* en humanos pertenecen al mismo grupo filogenético T4, lo que sugiere que las características que permiten a estas amebas infectar a los animales también pueden ayudarles a infectar a los humanos. En larvas de *Aedes aegypti* se encontró *Acanthamoeba* en un 87%. (Otta et al, 2012).

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución ambiental de *Acanthamoeba* spp, mediante análisis fenotípico y genotípico en muestras de agua, suelos y vegetales de las diferentes Regiones y Zonas de Chile, agrupándolas en las diferentes estaciones del año, clasificándolas en los Grupos de Pussard y Pons e identificando las de mayor riesgo del país en relación a los genotipos detectados.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las poblaciones de *Acanthamoeba* que habitan en Chile, clasificándolas en función de:
  1. Su morfología, según los grupos definidos por Pussard y Pons
  2. Su genotipo
- Estudiar si dichas poblaciones se ven influidas por la localización, el clima o la estacionalidad.
- Identificar las poblaciones que se distribuyen en las aguas naturales utilizadas con fines recreativos y las de consumo público, y por lo tanto identificando los genotipos predominantes de mayor riesgo.



## ***MATERIAL Y MÉTODO***



## MATERIAL Y MÉTODO

---

- 1 **Diseño metodológico: Estudio descriptivo de corte transversal.**
- 2 **Población objetivo:** Aguas, suelos y vegetales de las XV Regiones de Chile.
- 3 **Cálculo del tamaño de la muestra**

Se estimó el tamaño de muestra en base al antecedente del estudio de *Acanthamoeba* spp. en muestras de agua de equipos de aire acondicionado, en el cual se tomaron 48 muestras de agua, resultando positivas 34 ( $p=71\%$ ). Considerando para la estimación un error de estimación del 5% y un nivel de confianza del 95%, el tamaño de muestra estimado resultó en 317.

Cálculo del tamaño de muestra para proporciones:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 \times p \times q}{d^2}$$

donde:

$z_{\alpha/2} = 1,96$

$p = 0,71$

$q = 0,29$

$d = 0,05$

#### 4 Toma de las muestras

Se tomaron muestras de agua, suelo y vegetales en las XV Regiones de Chile y en 109 de las 346 comunas del país, el universo estuvo constituido por 532 muestras las que fueron recolectadas en los 4.200 km de Chile continental ( $17^{\circ}29'57''$  S y  $56^{\circ}32'$  S) y en Isla de Chiloé e Isla de Pascua de Chile insular (Lat.  $27^{\circ} 9'$  Sur y Long.  $109^{\circ}$ Oeste), entre los años 2009 y 2011 durante las 4 estaciones del año. El 30% de las muestras fueron recepcionadas en el

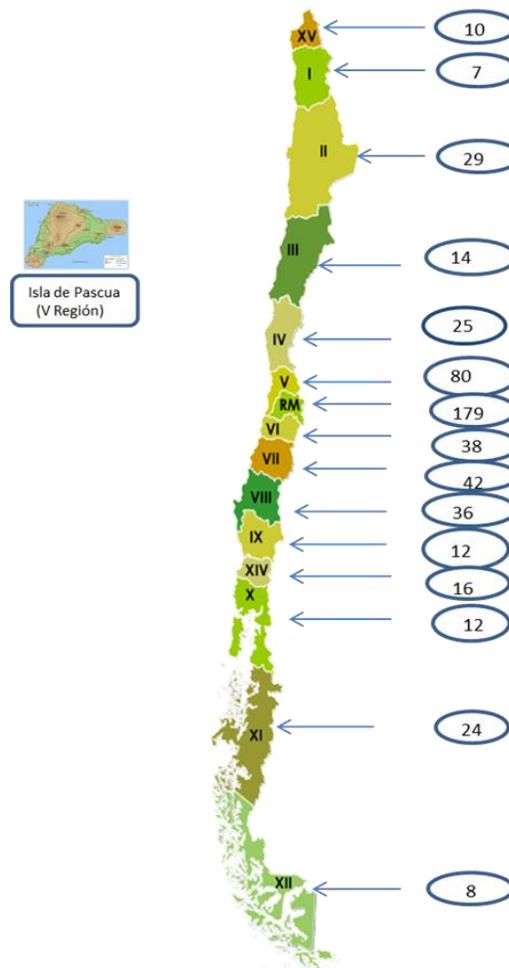
laboratorio, el resto fueron tomadas en salidas periódicas a terreno a las diferentes Regiones del país.

Foto N°24



Muestras de suelo y agua

Figura N°4. Mapa de Chile con número total de muestras por Regiones



#### 4.1 Muestras de agua:

Se tomaron 362 muestras en 106 comunas de todas las Regiones del país, que estuvieron integradas por los siguientes tipos de agua: 72 potable, 78 potable clorada, 33 de río, 58 de mar, 35 canal de regadío, 16 de laguna y lago, 13 de pozo, 8 pozo agua clorada, 6 de terma, 5 de embalse, 4 destilada, 3 de cascada, 2 agua potable rural, 2 de noria, 2 de vertiente, 1 de acequia, 1 de salar, 1 de volcán, 2 de humedal, 13 mineral con gas y 7 mineral sin gas.

Se recogieron 100 ml de agua por duplicado, a unos 10 a 20 cm de profundidad, en recipientes estériles de polipropileno de 250 ml y se conservaron a temperatura ambiente durante su transporte al laboratorio. Para tomar muestras de difícil acceso, como por ejemplo, agua de mar, se empleó un balde con mango extensible, que se muestra en las fotos N°40 y 41.

**Foto N°25**



Muestreador a distancia

**Foto N°26**



Puerto Talcahuano-VIII Región

**Foto N°27**



Playa Anakena-Isla de Pascua

**Foto N°28**



Río Antivero-VI Región

**Foto N°29**



**Foto N°30**



Humedal Lengua-VIII Región Cascada La Virgen-Aysén- XI Región

**Foto N°31**



Laguna Los Patos-Concepción

**Foto N°32**



Salto Río Laja-VIII Región

**Foto N°33**



**Foto N°34**



Agua de Pozo-V Región Agua de pozo clorada-V Región

**Foto N°35**



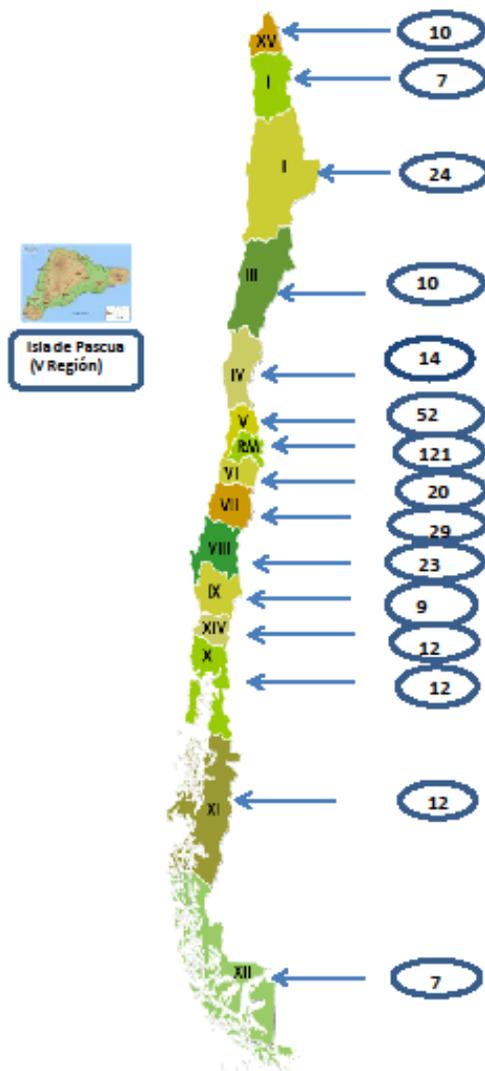
Agua salar Atacama-II Región

**Foto N°36**



Agua cráter Rano Kao-Isla de Pascua  
(Rapa Nui)-VRegión

**Figura N°5.** Mapa de Chile con número de muestras de agua por Regiones



#### 4.2 Muestras de suelo

Se tomaron 99 muestras de suelo en 46 comunas del país, integradas por 25 muestras de suelo de orilla del río, 25 muestras de arena, 20 muestras de suelo rural, 10 de suelo urbano, 9 suelo de orilla de laguna y lago, 6 de orilla de canal de regadío, 3 suelos de cascada, 1 de humedal. Se utilizó la técnica de muestreo de la Norma Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006, realizando un muestreo exploratorio y tomando una muestra superficial de aproximadamente 250 g, con una profundidad de hasta 5 cm.

**Foto N°37**



Suelo rural-La Higuera.

IV Región

**Foto N°38**



Muestras de arena y suelo urbano

Isla de Pascua. V Región

**Foto N°39**



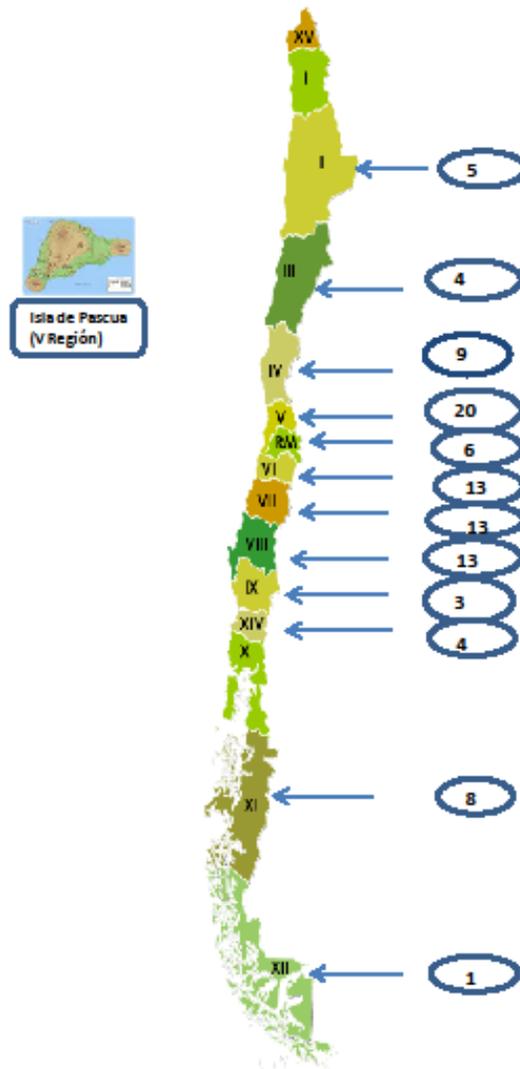
Suelo de río Maule-VII Región

**Foto N°40**



Transporte de las muestras

**Figura N°6.** Mapa de Chile con número de muestras de suelo por Regiones

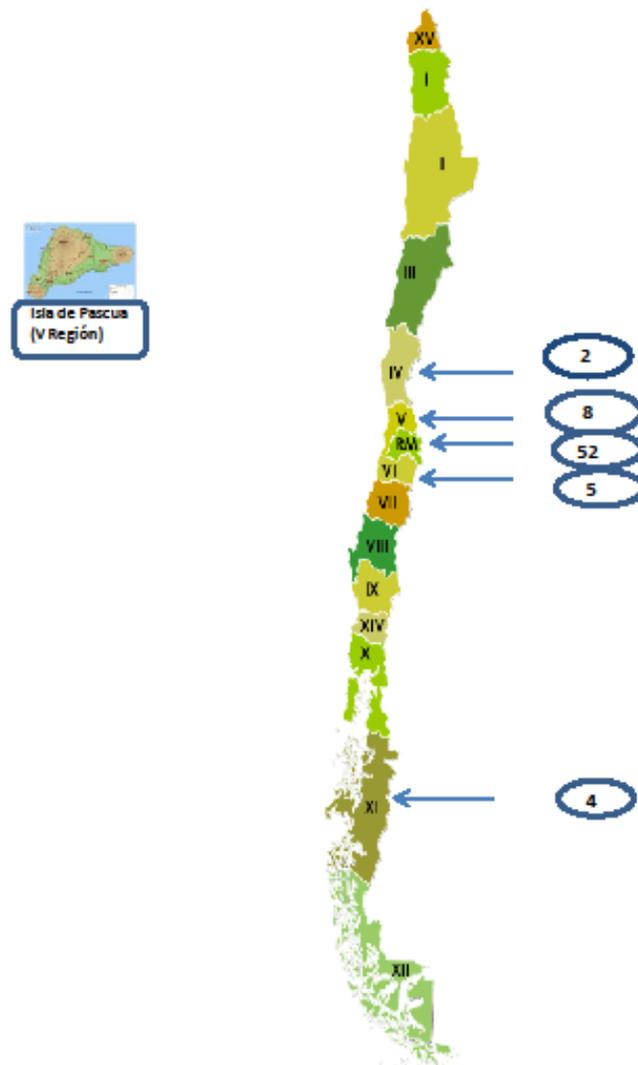


### 4.3 Muestras de vegetales

Se tomaron 71 muestras de vegetales en 12 comunas del país integradas por 10 muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), 2 achicorias (*Cichorium intybus* var. *sativa*), 6 acelgas (*Beta vulgaris* var. *cicla*), 6 cilantros (*Coriandrum sativum*), 6 zanahorias (*Daucus carota*), 5 repollos (*Brassica oleracea* var. *capitata*), 5 perejil (*Petroselinum sativum*), 3 espinacas (*Spinacia oleracea*), 3 coliflores (*Brassica oleracea*), 3

betarragas (*Beta vulgaris*), 3 apios (*Apium graveolens* var. *dulce*), 3 mentas (*Mentha piperita*), 2 berros (*Nasturtium officinale*), 2 oréganos (*Origanum vulgare*) y 1 muestra de puerro (*Allium porrum*), rabanito (*Raphanus sativus* L), haba (*Vicia faba*), ciboulette (*Allium schoenoprasum*), albahaca (*Ocimum basilicum*), mentacoca (*Tanacetum balsamita*), paico (*Dysphania ambrosioides*), ruda (*Ruta graveolens*), hierbabuena (*Mentha spicata*), hoja poroto verde (*Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*), piña (*Ananas comosus*) y teina. Las muestras se recogieron en ferias vecinales y predios agrícolas.

**Figura N°7.** Mapa de Chile con número de muestras de vegetales por Regiones



## 5 Procesamiento de las muestras

El análisis fenotípico se realizó en su totalidad en el Laboratorio de Referencia de Parasitología Ambiental del ISP (fotos N°41 y 42).

Foto N°41



Foto N°42



### 5.1 Muestras de agua

Para el aislamiento e identificación de *Acanthamoeba* spp. en muestras de agua se utilizó el Standard Method for the examination of water and wastewater, 21<sup>st</sup> Edition, 2005, mediante la metodología 9711 C. El método descrito es adecuado para la detección de especies de *Acanthamoeba* en muestras de agua potable, no potable, suelo y en este caso, además vegetales. La metodología consiste en concentrar la muestra al pasar a través de un filtro. Las *Acanthamoeba* spp. al tener un tamaño mayor que los poros de la membrana son retenidas en la superficie. Posteriormente los filtros se depositan en forma invertida en una placa con agar no nutriente y se incuban a 25°C y 37°C.

### 5.2 Muestras de suelo

Para obtener la cantidad de muestra para análisis se trabajó mediante la metodología del cuarteo (Norma Mexicana) que consiste en dividir la muestra en 4 partes, tomar una de las partes y dividirla nuevamente hasta obtener la cantidad

final de 2 g, la que se diluyó en 100 ml de agua destilada estéril. Las muestras se procesaron en duplicado mediante la misma metodología de las muestras de agua.

### **5.3 Muestras de Vegetales**

Se tomó una parte de cada una de las muestras, la que se diluyó en 100 ml de agua destilada estéril y se procesó en duplicado mediante la metodología mencionada anteriormente.

### **5.4 Procesamiento de muestras de agua, suelo y vegetales mediante membrana filtrante, para aislamiento de *Acanthamoeba* spp. (PRT-712.06-089) (PRT: Procedimiento técnico).**

#### **5.4.1 Equipos**

Bomba de vacío (Merck Millipore, EZ-Stream).

Manifold para 6 muestras.

Incubadoras reguladas a 25°C (Thelco), 37°C (Shellab), 42°C (Jouan) y 60°C (Jouan).

Microscopio óptico (Nikon Eclipse E200).

Mechero.

#### **5.4.2 Materiales**

Copas plásticas de filtración, graduadas y estériles de 47 mm de diámetro.

Porta filtros estériles

Filtros de membrana estériles de ésteres de acetato y nitrato de celulosa de 47mm y poro de 0,45 µm, superficie cuadrículada, fondo blanco.

Placas Petri plásticas estériles de 60 x 15mm.

Kitazato de 3 L.

Pinzas planas y lisas

Lentes de bioseguridad

Guantes

### **5.4.3 Medios de cultivo y reactivos**

Solución Page's

Agar no nutritivo.

Agar tripticase

#### **Solución Page's**

##### **Reactivos:**

Cloruro de sodio	0.12 g.
Sulfato de magnesio	0.004 g.
Cloruro de calcio dihidratado	0.004 g.
Fosfato disódico	0.142 g.
Fosfato potásico	0.136 g.
Agua destilada	1000 ml

##### **Preparación:**

Pesar y mezclar todos los reactivos

Traspasar a matraz y aforar a 1000 ml.

Alicuotar en tubos tapa rosca con 10 ml de solución Page's.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Etiquetar con nombre del reactivo, fecha e iniciales de la persona que lo preparó.

Almacenar a 4°C hasta 3 meses.

## **Agar no nutritivo**

### **Reactivos**

Agar no nutritivo	15 g.
Solución Page´s	1000 ml

### **Preparación:**

Pesar 15 g de agar no nutritivo.

Calentar 1000 ml de solución Page´s y agregar al agar.

Disolver hasta que la solución se observe transparente, evitando ebullición.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Enfriar aproximadamente a 50°C y vaciar en forma aséptica 15 a 20 ml a placa Petri.

Dejar solidificar.

Almacenar a 4°C hasta 3 meses.

Etiquetar con nombre del agar, fecha e iniciales de la persona que lo preparó.

### **Agar soya tripticase.**

Pesar 40 g. de agar soya tripticase.

Disolver en 1000 ml de agua destilada, calentando hasta su completa disolución.

Medir pH  $7.3 \pm 0.2$ .

Dispensar 7 ml en tubos de 16 x 160mm, con tapa rosca.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Dejar solidificar en una bandeja inclinada para obtener el agar tendido.

Almacenar bien cerrado a 4°C hasta 3 meses.

### **5.5 Cultivo de *Escherichia coli*, cepa ATCC N°25922.**

Se mantuvo la cepa de *Escherichia coli*, realizando traspaso diario en 5 tubos con agar soya tripticase.

#### **5.5.1 Emulsión de *Escherichia coli*.**

A tubos de cultivo con buen desarrollo se le agregó 5 ml de solución Page's, removiendo suavemente las colonias para formar una emulsión.

### **5.6 Preparación de agar para cultivo de amebas de vida libre.**

Se recoge la emulsión de *Escherichia coli* preparada anteriormente, se deposita en foma de película superficial en las placas de agar no nutritivo, quedando el agar listo para siembra o traspaso de amebas de vida libre.

### **5.7 Procedimiento de filtración de las muestras:**

Encender el mechero.

Con una pinza estéril, plana y lisa poner la membrana filtrante de 0,45 µm con el cuadrículado hacia arriba sobre la placa porosa del receptáculo del portafiltro.

Ubicar las copas de filtración asegurándose que queden bien cerradas.

Homogeneizar la muestra agitándola vigorosamente.

Verter 100 mL de muestra en la copa de filtración en forma aséptica.

Cerrar la tapa.

Aplicar vacío y filtrar la muestra, la que pasará a través de la membrana a un flujo de no más de 1.3 mL/min.

Una vez terminada la filtración, detener la bomba y retirar la copa de filtración.

## 5.8 Cultivo de las muestras

Inmediatamente tomar con una pinza estéril el filtro de membrana y ponerlo en forma invertida sobre el agar no nutritivo que contenga una película de suspensión de *Escherichia coli*.

Incubar las placas a temperaturas de 25°C y 37°C  $\pm$  0,5°C, el crecimiento de la ameba en el cultivo se realiza colocando la placa invertida sobre la platina del microscopio óptico usando lente objetivo 10x, observando la placa diariamente en busca de trofozoítos y/o quistes. Las muestras fueron consideradas negativas cuando no hubo crecimiento después de 10 días de incubación.

En las placas que se observen trofozoítos y/o quistes de *Acanthamoeba* spp., se debe marcar la zona en la cara posterior de la placa, con lápiz marcador de tubos.

Con un bisturí cortar el agar en la zona marcada y depositar en forma invertida en una nueva placa, incubar a la temperatura respectiva (25°C ó 37°C) y observar diariamente al microscopio.

**Foto N°43**



Equipo de filtración

**Foto N°44**



Ubicación filtro en copa filtración

Foto N°45

Foto N°46



Filtración de muestra de agua      Depósito del filtro en placa con ANN

### 5.9 Aislamiento de *Acanthamoeba* spp.

La eliminación de larvas, ácaros, hongos y aislamiento de diferentes géneros de AVL, se realizó mediante sucesivos trasposos en cultivo en placa Petri. Una vez que se obtuvo un cultivo puro o más o menos puro con *Acanthamoeba* spp., se traspasó a 5 nuevas placas con medio de cultivo.

Foto N°47

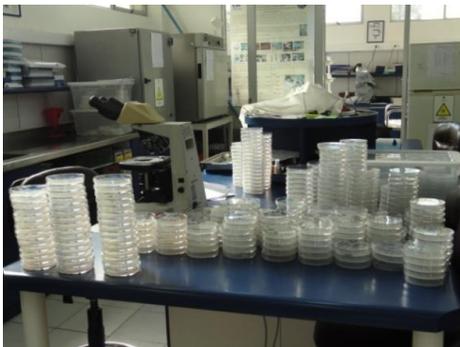
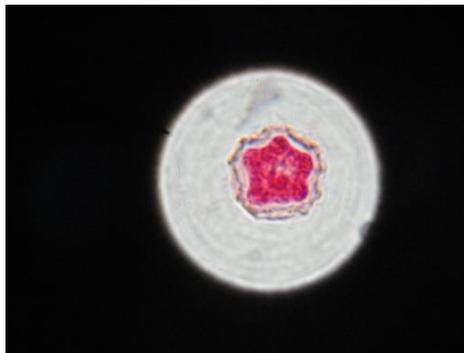


Foto N°48



Revisión microscópico de cultivos      Quiste *Acanthamoeba* spp. con tinción tricrómica.

## 6 Análisis fenotípico

La identificación morfológica de los trofozoitos y/o quistes cultivados en las placas se realizó siguiendo los criterios morfológicos documentados por Smirnov and Goodkov (1999), que proponen una lista de 19 morfotipos básicos para miembros de la clase

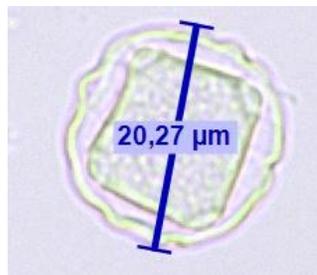
Lobosea, subclase Gymnamoebia. La identificación morfológica fue complementada utilizando las claves de identificación de Page (Page, 1988).

### 6.1 Clasificación de Pussard y Pons

Para llevar a cabo el análisis, se tomó fotografía con mediciones a 10 quistes de *Acanthamoeba* spp. por muestra en microscopio Leica DM 2000 LED, con objetivo 40x y cámara fotográfica DFC 450C. Las especies aisladas fueron clasificadas de acuerdo a lo establecido por Pussard y Pons en 1977, dividiendo el género *Acanthamoeba* en tres grupos en base a las diferencias de tamaño y características morfológicas de los quistes.

El grupo I consiste en especies caracterizadas por grandes quistes y trofozoitos, con endoquiste en forma estrellada y ectoquiste que pueden ser lisos o rugosos, con un diámetro promedio del quiste  $\geq 18 \mu\text{m}$ .

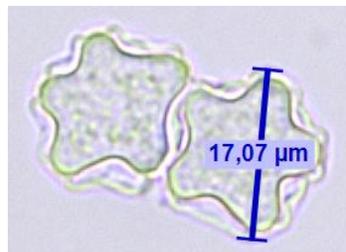
**Foto N°49**



*Acanthamoeba* spp. Grupo I

Al grupo II pertenecen amebas con quistes  $< 18 \mu\text{m}$ , donde el ectoquiste es rugoso, mientras que el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado.

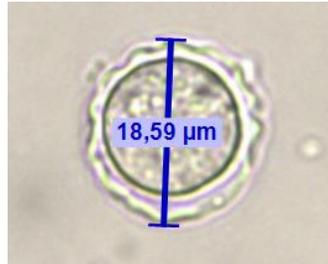
**Foto N°50**



*Acanthamoeba* spp. grupo II

En el grupo III, el diámetro promedio de los quistes es  $< 19 \mu\text{m}$  y el ectoquiste es delgado y ondulado mientras que el endoquiste es generalmente redondeado.

**Foto N°51**



*Acanthamoeba* spp. grupo III

## **6.2 Obtención de amebas concentradas para extracción de ADN (ácido desoxirribo nucleico).**

Se seleccionaron las placas de cultivo con mayor cantidad de amebas. A cada placa se le agregaron 1-2 ml de solución Page's y con un asa de Drigalski se removieron los quistes de la película superficial del cultivo, posteriormente se aspiró el líquido con una pipeta y se depositó en criotubos, que se centrifugaron a 6.000 rpm durante 10 minutos, enseguida se eliminó el sobrenadante, dejando unos 0.5 ml de sedimento. Para comprobar la calidad del material obtenido se tomó una gota del sedimento y se observó al microscopio con el fin de seleccionar los criotubos que presentaron mayor concentración de amebas para realizar la extracción de ADN.

## **7 Análisis genotípico**

La confirmación de los aislamientos morfológicos de *Acanthamoeba* spp. por PCR se realizaron en una primera etapa en el Laboratorio de Referencia de Parasitología de la Universidad de Zaragoza y posteriormente en el Laboratorio de Parasitología Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile. Para la primera etapa se enviaron los concentrados de las amebas desde Santiago de Chile, de acuerdo a las normas de bioseguridad de la OMS y de la legislación Española.

**Foto N°52**



**Foto N°53**



**Foto N°54**



Recepción de concentrados y cultivos de muestras enviadas desde Chile

## **7.1 Extracción de ADN**

Se realizó con reactivos comerciales y con shock térmico.

Los reactivos comerciales utilizados fueron los siguientes:

### **7.1.1 Extracción con reactivos comerciales**

- Kit Favor PrepTissue genomic-DNA extraction Minikit Favorgen para 50 determinaciones.
- Ron'sTissue DNA Mini Kit, Bioron, catálogo N°803496 para 50 determinaciones. Lote PL10013751-3 y Lote P105552

Reactivos adicionales requeridos: etanol a 70%, RNeasa A 20 mg/ml, catálogo N°405155, perlas de zirconio (0.5 mm glass beads, catálogo11079105, Biospec Products, Inc).

El volumen total del criotubo se dividió en dos partes para dejar una contramuestra, cada criotubo se centrifugó a 10.000 rpm por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante. Se realizó la metodología de acuerdo a las instrucciones del fabricante, incubando a 52°C toda la noche.

### **7.1.2 Extracción por shock térmico**

Al no llegar a tiempo al laboratorio el kit de extracción solicitado, se decidió realizar algunas extracciones mediante la técnica de fenol-cloroformo y shock térmico. Con

las dos metodologías se obtuvieron resultados positivos al realizar el PCR y aunque las imágenes de los PCR se observaron mejor con el método de fenol-cloroformo, por razones prácticas se decidió realizar la extracción con shock térmico.

## Equipos

Centrífuga Marca Hermle, modelo Z326K.

Freezer marca Haier

Baño de agua

## Procedimiento

Se centrifugó el criotubo con *Acanthamoeba* spp. a 6.000 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante.

Se congeló a -20 °C por 10 minutos.

Se calentó en baño maría a 100°C por 10 minutos.

Se repitieron 3 veces los pasos 2 y 3.

El ADN resultante se congeló a -20°C hasta su utilización.

### 7.2 Análisis por PCR

**PCR:** es la sigla en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa, técnica dada a conocer por Kary Mullis en 1983, es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Los elementos estructurales del ADN son los nucleótidos y son los siguientes: dATP (desoxiadenosina-trifosfato), dGTP (desoxiguanosina), dTTP (desoxitimidina trifosfato), dCTP (desoxicitidina-trifosfato). Los 4 nucleótidos se denominan dNTPs (desoxinucleósido-trifosfato). Un nucleótido está formado por una base púrica; adenina (A) o Guanina (G), o una base pirimidínica; citosina (C) o timina (T), un azúcar pentosa (desoxirribosa) y un grupo trifosfato. La replicación del ADN es el proceso en que se basa la amplificación por PCR y consiste en que la molécula de ADN se desenrolla y cada cadena se convierte en un ADN molde para la síntesis de una cadena complementaria nueva, el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN

monocatenario. Para desenrollar la doble hélice y sintetizar una nueva hebra de ADN hacen falta varias enzimas, la ADN polimerasa es la que se encarga de la síntesis progresiva de nuevas hebras de ADN y actúa desde el extremo 5' hacia el 3'.

La técnica consiste en ciclos repetitivos de:

Desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada para convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario.

Unión de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores al ADN diana.

Extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa Taq como catalizador, en presencia de iones  $Mg^{2+}$ .

### 7.2.1 Equipos:

- A. Termociclador marca Applied Biosystem, versión 2.09.
- B. Termociclador marca G-Storm, modelo GS482, con 2 bloques independientes para 48 muestras.

### 7.2.2 Reactivos

Los primers son pequeños fragmentos de ADN que son complementarios a cada una de las extremidades de la secuencia de ADN de interés. Los oligonucleótidos JDP1 y JDP2 amplifican una región complementaria al gen 18SrDNA. El amplicón generado se denomina ASA.S1, el cual tiene una región variable que permite la consiguiente identificación por secuenciación y clasificación en los diferentes genotipos (Schroeder y cols, 2001).

Primer JDP1: GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A

Primer JDP2: TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA

### 7.2.3 MIX por reacción

Agua	:	5.5 $\mu$ l
Tampón $MgCl_2$	:	5.0 $\mu$ l
$MgCl_2$ 50Mm	:	4.0 $\mu$ l
dNTPs	:	0.5 $\mu$ l
JDP1	:	5.0 $\mu$ l

JDP2 : 5.0 µl  
Polimerasa Taq : 0.3 µl :

#### 7.2.4 Reacción de amplificación

##### Tubo de PCR

Agua : 23 µl  
DNA : 2 µl  
Mix : 25 µl  
Volumen total : 50 µl

Además se utilizó el reactivo GoTaq® Green Master Mix.

Control positivo, muestras genotipadas en España.

Control negativo (Agua DEPC)

Control de reactivos (Master Mix)

#### 7.2.5 Amplificación:

Los tubos se colocaron en el termociclador y se aplicaron los siguientes programas:

A. Termociclador (45 ciclos)		B. Termociclador (35 ciclos)	
95°C	7 minutos	94°C	5 minutos
95°C	1 minuto	94°C	30 segundos
60°C	1 minuto	60°C	30 segundos
72°C	2 minutos	72°C	1 minuto
72°C	10 minutos	72°C	7 minutos
4°C	Término	10°C	término

Retiro del equipo y almacenamiento del producto del PCR a -20°C hasta su posterior uso. El amplicón generado corresponde a una banda entre 423 a 551 pb (pares de base).

### **7.3 Electroforesis en gel**

Es una técnica que consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel, es utilizada para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN, en este caso, analizar los fragmentos obtenidos en el PCR, permitiendo la separación de acuerdo al tamaño de cada uno. Cuando se aplica un campo eléctrico a un gel, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo. Los fragmentos del gel se visualizan por la incorporación, por ejemplo; de bromuro de etidio, que es una molécula que se intercala en las bases del ADN y brilla con luz UV a una longitud de onda determinada con lo cual podemos observar las bandas de ADN en el gel.

#### **7.3.1 Equipos**

Balanza Metter AE160

Balanza marca Radwag, modelo AS 220/c/2

Cámara de electroforesis horizontal (Biocom Direct. Com. Serial N°BCMS 1509101219 y Vari-Gel serial N°502).

Cámaras de electroforesis, marca Hoefer, modelo Sub13 y Sub6

Fuente de poder marca Major Science, modelo MP-500V, para 4 cámaras.

Transiluminador de luz UV ViberLourmet

Capturador de imágenes ViberLourmet

Transiluminador marca Bío-Rad modelo Gel Doc XR

Microondas marca Samsung

#### **7.3.2 Materiales**

Micropipetas

Probetas

Gradilla para tubos

Peines

Material de vidrio

Bandeja nivelada

Espátula

### **7.3.3 Reactivos**

Agarosa al 1.5% y 1,8%

Tampón TBE (Tris Borato EDTA) al 0.5x, pH 8

Bromuro de etidio (0.5 µg/ml)

Azul de bromofenol (buffer de carga)

Marcador 100pb DNA Ladder

Migración a 100 voltios

Los tubos con el resto de producto del PCR se conservaron a -20°C.

## **Procesamiento**

### **Preparación del agar**

Se pesó 1,5 g y se disolvió en 100 ml de tampón TBE al 0.5%, en horno microondas. Lograda la total disolución se dejó enfriar alrededor de 60°C y se le agregó 3 µl de bromuro de etidio.

### **7.3.4 Llenado del soporte con el agar.**

El agar se agrega en el soporte o molde con sus extremos sellados previamente para evitar el escurrimiento y que contiene además el peine respectivo para formar las ranuras que contendrán los controles y muestras, si quedan algunas burbujas, rápidamente con la punta de una pipeta se pueden pinchar y eliminarlas, ya que podrían entorpecer la migración homogénea. El agar se dejó solidificar, posteriormente se retiró el peine, el sellado de los extremos y se ubicó el soporte con el agar en la cámara de electroforesis.

### **7.3.5 Llenado de las ranuras del agar con los controles y muestras.**

Sobre papel parafilm se realiza la mezcla de 2 µl de azul de bromofenol (solución de carga) más 5 µl de marcador de peso molecular, controles negativo, positivo y muestras. Estas mezclas se introducen en cada una de las ranuras del agar ubicado en la cámara de electroforesis. Se llena la cámara de electroforesis con tampón TBE al 0.5 % hasta cubrir el agar. Este tampón es muy estable por lo cual puede reutilizarse varias veces. Al completar esta etapa se cierra la cámara, se conecta a la fuente de poder, realizándose la migración de cátodo a ánodo, entre 97 a 100 volt en un tiempo aproximado de 1 hora. Pasado este tiempo se desconecta la fuente de poder, se retiran los cables conectados a la cámara de electroforesis, se abre y se retira el soporte con el gel.

### **7.3.6 Ubicación del gel en el transiluminador y fotografía.**

El gel se coloca directamente en el transiluminador, se enciende para observar las bandas resultantes, posteriormente se ubica sobre el gel la cámara fotográfica, la imagen obtenida se almacena en formato digital.

### **7.3.7 Purificación de banda para secuenciación.**

Se realizó una segunda PCR de las muestras que dieron positivas, se juntaron las 2 PCR por muestra en un solo tubo y se le agregó 8 µl de azul de bromofenol.

Se preparó agar al 2 % y se ubica un peine al cual se le selló una ranura por medio para lograr ranuras de mayor tamaño, las que se llenaron con todo el material preparado descrito en el párrafo anterior. A 5 µl de marcador de peso molecular se le agregó 3 µl de azul de bromofenol. La electroforesis se desarrolló entre 99 y 100 voltios. Posteriormente se trasladó el agar al transiluminador en el cual se observó las bandas fluorescentes, las que se cortaron con bisturí y fueron introducidas en el tubo eppendorf respectivo.

El producto obtenido se procesó de acuerdo al protocolo de Purificación de ADN del reactivo: "illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit". El ADN purificado obtenido se almacenó a -20°C hasta su envío a secuenciar.

### 7.3.8 Repetición de muestras no confirmadas por PCR.

Las muestras con diagnóstico morfológico de *Acanthamoeba* spp. que no se confirmaron por PCR, se cultivaron nuevamente y se repitió el PCR.

## 7.4 Secuenciación

### 7.4.1 Secuenciación en España

Algunas muestras que fueron positivas por PCR se enviaron a secuenciar al Centro de Análisis Genético de Zaragoza. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos disponible del Genbank.

### 7.4.2 Secuenciación en Chile

En el laboratorio del Subdepartamento Genética Molecular del ISP, el análisis del amplicón ASA.S1 (región DNAr 18S) para la genotipificación de *Acanthamoeba* se realizó con secuenciamiento automático en equipo ABI 3500. Las muestras fueron comparadas nucleotídicamente con las cepas de referencia de los distintos genotipos descritos (Tabla N°4), entregando un informe de resultados con el tipo genético encontrado en la muestra.

### 7.4.3 Repetición de muestras no secuenciadas

Las *Acanthamoeba* spp. que no se lograron secuenciar se cultivaron nuevamente, se repitió el PCR y se volvió a enviar a genotipar.

### 7.4.4 Elaboración de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos serán generados con software bioinformático Mega v6.06 con método estadístico Máxima verosimilitud, test de filogenia 1000 bootstrap y modelo de sustitución Tamura 3-parameter model

**Tabla 4.** Secuencias de referencia usadas para la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba*.

Nombre de cepa de referencia	Gbank	Genotipo
<i>Acanthamoeba castellanii</i> CDC:0981:V006	U07400	T1
<i>Acanthamoeba</i> sp. E_5C	AB425955	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. SE2_6F	AB425949	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. OB3b_3A	AB425945	T2

<i>Acanthamoeba pustulosa</i> GE3a	AF019050	T2
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> OX-1	AF019051	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. EI5	AM408800	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. EI4	AM408799	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/MSG27	AY173011	T2
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> strain ATCC30872	AY026244	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. WR	HM159368	T2
<i>Acanthamoeba palestinensis</i> Reich ATCC 30870	U07411	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. EFW7	DQ992192	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. EFW9	DQ992193	T2
<i>Acanthamoeba</i> sp. EFW15	DQ992189	T2
<i>Acanthamoeba pearcei</i>	AF019053	T3
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> Panola Mountain	AF019052	T3
<i>Acanthamoeba griffini</i> S-7 ATCC 30731	U07412	T3
<i>Acanthamoeba griffini</i> H37	S81337	T3
<i>Acanthamoeba</i> sp. AcaVN06	GQ397468	T3
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> Page-23	AF019061	T4
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	AF005995	T4
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> Nagington	AF019062	T4
<i>Acanthamoeba triangularis</i>	AF316547	T4
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> strain ATCC30461	AY026243	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. GERF3	HM363628	T4
<i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff ATCC 50373	U07416	T4
<i>Acanthamoeba royreba</i> Oak Ridge ATCC 30884	U07417	T4
<i>Acanthamoeba castellanii</i> Castellani U07413	U07413	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC # V328	AY702999	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E13	AY148959	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E14	AY148960	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E6	AF349044	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. Jin-E5	AF019054	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E18	AY148964	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. ATCC 50498	U07404	T4
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> 2AX1	AF019060	T4
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> strain 2HH	AF260722	T4
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AF260725	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. ATCC 50496	U07408	T4
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	AF260719	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/MSG26	AY173010	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/E27	EF140628	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. AcaVN14	GQ397476	T4
<i>Acanthamoeba castellanii</i> strain AA2	EF176006	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. PAT05	EF429130	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. ATCC 50497	U07410	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. COHH 55	GU320592	T4
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/MSG12	AY173006	T5

<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain PD2S	U94741	T5
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain 407-3a	U94734	T5
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain 118	U94736	T5
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain 45	U94730	T5
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain 53-2	U94737	T5
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain 25/1	U94740	T5
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> strain 68-2	U94733	T5
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> 11DS	AF251939	T6
<i>Acanthamoeba</i> sp. KA/MSS1	AY172999	T6
<i>Acanthamoeba palestinensis</i> 2802	AF019063	T6
<i>Comandonia operculata</i>	AY033896	T6
<i>Acanthamoeba</i> sp. EFW5	DQ992178	T7
<i>Acanthamoeba astronyxis</i> Ray & Hayes	AF019064	T7
<i>Acanthamoeba tubiashi</i> OC-15C	AF019065	T8
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	AY026242	T9
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E2b	GU808281	T9
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E2a	GU808280	T9
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E2c	GU808282	T9
<i>Acanthamoeba healyi</i>	AF019070	T10
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_P4	GU808320	T10
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> BH-2	AF019068	T11
<i>Acanthamoeba stevensoni</i> RB:F:1	AF019069	T11
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E13	GU808311	T11
<i>Acanthamoeba</i> sp. PN14	AF333608	T11
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> 4RE	AF251937	T11
<i>Acanthamoeba healyi</i>	AF019070	T12
<i>Acanthamoeba</i> sp.	AY102615	T13
<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC9	AF132134	T13
<i>Acanthamoeba</i> sp. UWET39	AF132136	T13
<i>Acanthamoeba</i> sp. PN13	AF333609	T14
<i>Acanthamoeba</i> sp. PN15	AF333607	T14
<i>Acanthamoeba</i> sp. AcaVNAK01	GQ905495	T15
<i>Acanthamoeba jacobsi</i> AC194	AY262362	T15
<i>Acanthamoeba jacobsi</i> AC080	AY262361	T15
<i>Acanthamoeba jacobsi</i> ATCC 30732	AY262360	T15
<i>Acanthamoeba</i> sp. U/H-C1	AY026245	T16
<i>Acanthamoeba</i> sp. cvX	GQ380408	T16
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E1c	GU808279	T17
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E1b	GU808278	T17
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E9b	GU808302	T17
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E1a	GU808277	T17
<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E9a	GU808301	T17
<i>Acanthamoeba</i> sp. CDC:V621 clone 1	KC822461.1	T18
<i>Acanthamoeba</i> sp. USP-AWW-A68	KJ413084.1	T19
<i>Acanthamoeba</i> sp. OSU 04-023 clone 2	DQ451162.1	T20

## **8 Parámetros de análisis**

### **8.1 Agrupación de regiones en 3 zonas.**

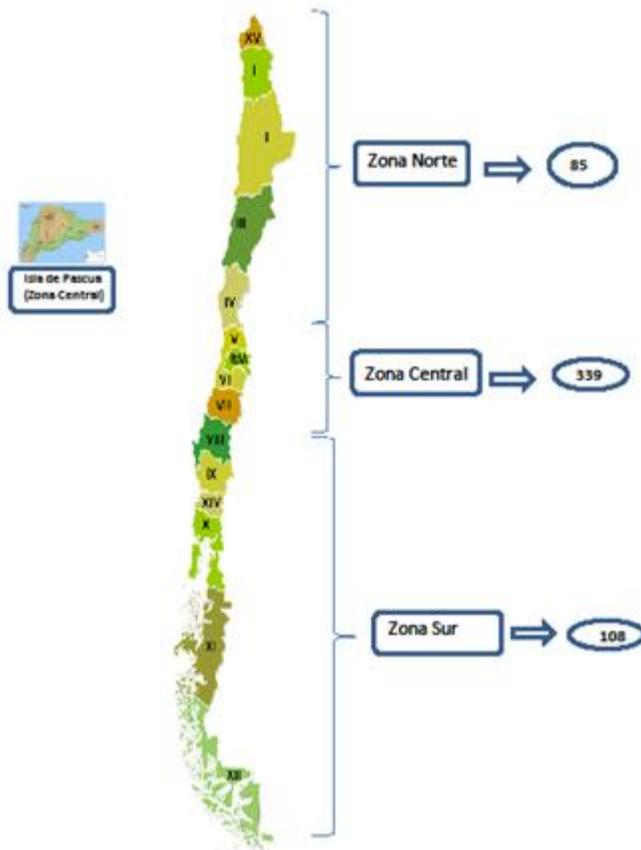
Con fines de análisis estadístico se decidió agrupar las XV Regiones actuales del país en 3 grupos, basados en la definición de Regiones naturales en Chile realizado por la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO) en 1950, que agrupó al país en zonas.

**Zona norte** agrupó las Regiones XV (Región Arica-Parinacota), I (Región de Tarapacá), II (Región de Antofagasta), III (Región de Atacama) y IV (Región de Coquimbo).

**Zona centro** agrupó las Regiones V (Región de Valparaíso), XIII (Región Metropolitana), VI Región del Libertador Bernardo O'Higgins), VII (Región del Maule).

**Zona sur** agrupó a las Regiones VIII (Región del Bío Bío), IX (Región de la Araucanía), XIV (Región de los Ríos), X Región de Los Lagos), XI (Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo) y XII (Región de Magallanes y de la Antártica Chilena).

**Figura N°8.** Mapa de Chile con el total de muestras por zonas



## 8.2 Clasificación de las muestras de acuerdo a la estación de toma de muestras.

Con los registros de fecha de toma de las muestras se agruparon las muestras con cultivo positivo a *Acanthamoeba* spp. de acuerdo a las estaciones del año.

## 8.3 Clasificación de las muestras de agua de acuerdo a su uso.

Las aguas se clasificaron en recreacionales, de consumo y otros usos.

## 8.4 Día de positividad de los cultivos

Se evaluaron los registros de día de positividad de los cultivos a 25°C y 37°C con el fin de determinar si los 10 días de incubación fueron los adecuados.

## 8.5 Muestras de agua de piscinas

Las muestras de agua de piscinas, que en su mayoría fueron tomadas por la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI), que es el organismo fiscalizador dependiente del Ministerio de Salud, proporcionaron el registro de los parámetros evaluados en su fiscalización, con los cuales ellos clasifican las piscinas en dos grupos, las que cumplen y las que no cumplen el reglamento de piscinas de uso público (Decreto N°209, de 2002, modificado 43/06, 2006 del Ministerio de Salud).

Foto N°55



Foto N°56



Fotro N°57



Equipo y reactivos para análisis de cloro y ph en piscinas

Foto N°58



Foto N°59



Piscina Abierta Pública (municipal) Piscina Cubierta Pública (municipal)

## 8.6 Determinación del grado de termotolerancia a las amebas aisladas

Los cultivos positivos inicialmente a 25°C y 37°C, se sometieron a temperatura de 42°C por 7 días, para lo cual se sembraron 7 placas por muestra, marcándolas con letras "a" hasta la "g", diariamente se revisaron microscópicamente marcando el crecimiento o el aumento de crecimiento de *Acanthamoeba* spp. en la placa "a" y

diariamente se retiraba de la incubadora una placa de las marcadas desde “b” hasta “g” marcando el área de crecimiento con el fin de traspasarlas a dos nuevas placas e incubarlas a 25°C y 37°C, para verificar su sobrevivencia. La placa de cultivo marcada con “a” estuvo los 7 días en la incubadora y fue la última en la que se verificó la sobrevivencia de las amebas. Posteriormente se sembró una placa incubándola a 60°C por 24 horas y se observó el crecimiento de las amebas.

## 9 Conservación de *Acanthamoeba* spp genotipadas

Una vez genotipadas las muestras, los criotubos con los concentrados de los sedimentos de las *Acanthamoeba* genotipadas se rotularon y almacenaron en cajas en el refrigerador, además las amebas se sembraron en tubos con agar no nutritivo tendido con *Escherichia coli*, almacenándolos a temperatura ambiente, con el fin de mantener un cepario con *Acanthamoeba* genotipadas.

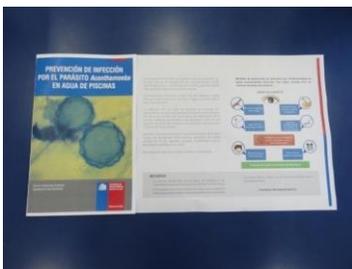
### Foto N°60



## 10 Diseño de díptico de prevención de infección por *Acanthamoeba* spp.

Se diseñó un díptico con medidas de prevención de infección ocular por *Acanthamoeba* spp., para ser distribuidos a la población usuaria de piscinas.

### Foto N°61



## **11 Análisis estadístico**

Las variables cualitativas fueron representadas gráficamente a través de tablas de distribución de frecuencias y gráficos de barras o circulares.

Para las variables cuantitativas discretas se informaron los valores de las modas, los mínimos y máximos.

Se estimaron “proporciones” de variables cualitativas, con sus respectivos intervalos de confianza (95%).

La evaluación de asociaciones de variables categóricas se realizó a través de la prueba de Chi Cuadrado, o de Fisher, considerándose un nivel de significación del 5%.

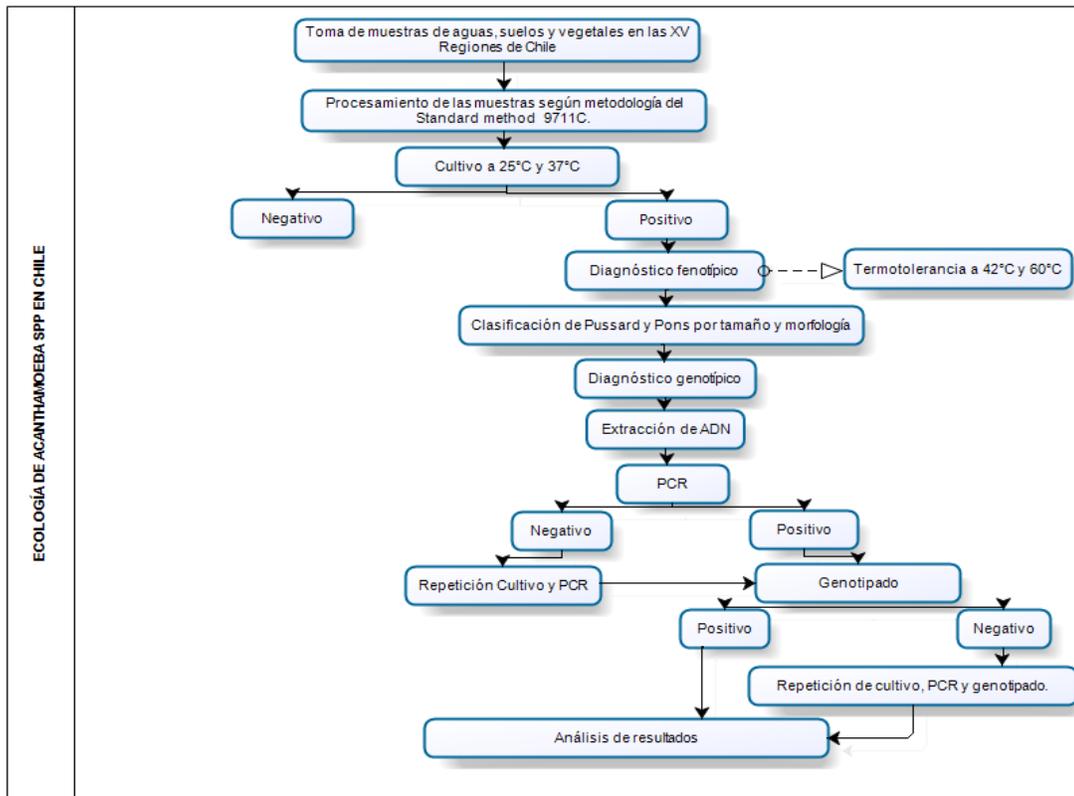
Se compararon variables de tipo ordinales utilizando pruebas no paramétricas de Kruskal-wallis.

Los análisis estadísticos se hicieron con Statgraphics.

**Tabla N°5. Variables de interés en el análisis estadístico**

<b>Variable</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala</b>	<b>Operacionalización</b>
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Cualitativa	Dicotómica	Presencia o ausencia
Tipo de agua	Cualitativa	Categórica	agua potable, potable clorada, río, mar, canal de regadío, laguna y lago, pozo, pozo agua clorada, terma, embalse, destilada, cascada, potable rural, noria, vertiente, acequia, de salar, de volcán, humedal, mineral con gas y mineral sin gas.
Tipo de suelo	Cualitativa	Categórica	Suelo urbano, rural, de río, laguna, lago, cascada, canal de regadío, arena.
Tipo de vegetal	Cualitativa	Categórica	Lechuga, achicoria, acelga, cilantro, zanahoria, repollo, perejil, espinaca, coliflor, betarraga, apio, menta, berro, orégano, puerro, rabanito, haba, ciboulette, albahaca, mentacoca, paico, ruda, hierbabuena, hoja poroto verde, piña y teina.
Regiones	Cualitativa	Categórica	I a la XV
Zonas	Cualitativa	Categórica	Norte, Centro y Sur.
Estación del año	Cualitativa	Categórica	Otoño, Invierno, Primavera, Verano.
Día de cultivo positivo 25 y 37°C.	Cuantitativa	Discreta	Día 1 al día 10.
Temperatura de aislamiento en cultivo a 25 y 37°C.	Cualitativa	Dicotómica	Positivo o negativo.
Termotolerancia a 42°C	Cualitativa	Dicotómica	Positivo o negativo.
Termotolerancia a 60°C	Cualitativa	Dicotómica	Positivo o negativo.
Clasificación de Pussard y Pons	Cualitativa	Categórica	Grupos I, II y III
PCR	Cualitativa	Dicotómica	Positivo o negativo.
Genotipado	Cualitativa	Categórica	Genotipos T1 al T20
Piscinas	Cualitativa	Dicotómica	Cumple o no cumple reglamento de piscinas

**Figura 9. Fases del estudio**



**12 Descriptores de la tesis:**

Agua, suelos, vegetales	Contaminación	<i>Acanthamoeba</i> spp	Genotipado	Chile
-------------------------	---------------	-------------------------	------------	-------



## ***RESULTADOS***



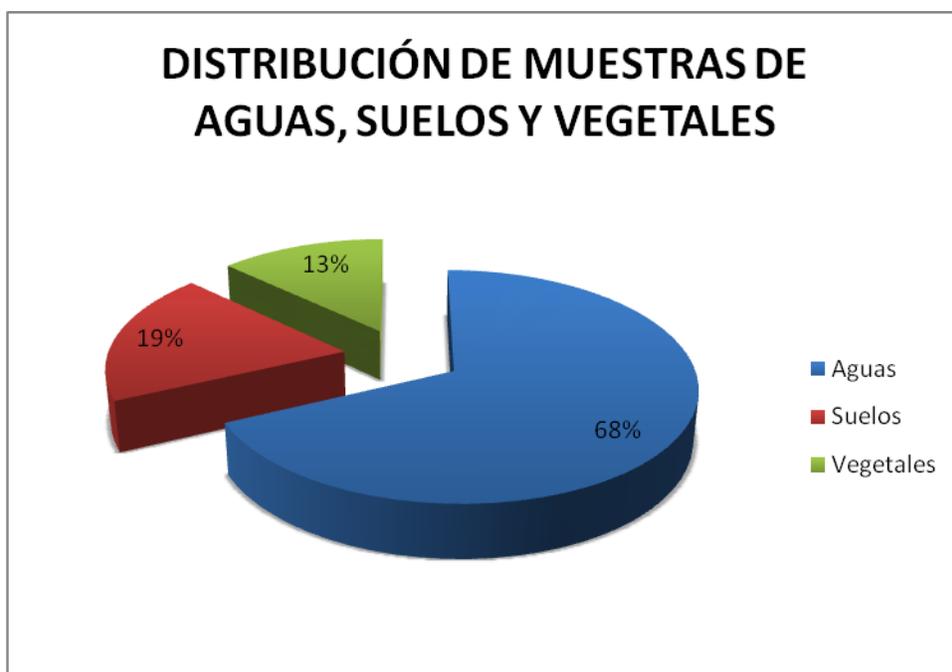
### III RESULTADOS

---

Aunque en el cálculo del tamaño de la muestra, ésta resultó de 317 muestras, se decidió aumentar el número con el fin de lograr una mejora en el estudio y conocer la distribución ambiental de *Acanthamoeba* spp. en el país.

En el gráfico N°1 se muestra la distribución de las muestras recogidas según su origen. Como se observa, las 532 muestras estudiadas, estuvieron constituidas por 362 (68%) muestras de agua, 99 (19%) muestras de suelo y 71 (13%) muestras de vegetales.

**GRÁFICO N°1**



## **A. RESULTADOS DE LA TOTALIDAD DE LAS MUESTRAS**

### **1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS DE LA TOTALIDAD DE LAS MUESTRAS**

#### **1.1 Contaminación de los cultivos con larvas de nematodos, ácaros y hongos.**

Algunas muestras ambientales estaban muy contaminadas, por lo tanto, en cultivos positivos, el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. significó muchos subcultivos sucesivos para eliminar larvas, ácaros, hongos y otros géneros de AVL, que fueron diferenciados por observación microscópica de sus características morfológicas. Los cultivos de las muestras que presentaron larvas de nematodos y ácaros, fueron 28 en total, en 16 muestras se encontraron larvas y en 12 muestras ácaros.

##### **1.1.1. Contaminación por larvas**

Las muestras en que crecieron larvas fueron 16. De estas muestras 3 eran de agua (2 ríos y 1 canal de regadío), de ellas 1 fue positiva a *Acanthamoeba* spp., en cultivo incubado a temperatura de 25°C. En 5 muestras de suelo (2 suelos de río, 1 suelo rural, 1 canal de regadío y 1 arena) se observaron larvas y las 5 fueron positivas a *Acanthamoeba* spp., 4 a temperatura de 25°C y 1 a temperatura de 37°C. En 8 muestras de vegetales se encontraron larvas, 3 a temperatura de 25°C y 5 a temperatura de 37°C, 2 de ellas fueron positivas a *Acanthamoeba* spp. en cultivos a 37°C (lechuga y ruda) y 1 fue positiva a *Acanthamoeba* spp. a 25°C (orégano), lo que se presenta en la Tabla N°5.

**TABLA N°6**

**CONTAMINACIÓN DE CULTIVOS DE *Acanthamoeba* spp. CON LARVAS**

Tipo de muestras	Total de muestras con larvas	Cultivo Positivo a <i>Acanthamoeba</i> spp. con larvas	Cultivo Negativo a <i>Acanthamoeba</i> spp. con larvas	Cultivo a 25°C con larvas	Cultivo a 37°C con larvas
<b>Aguas</b>	3	1	2	2	1
<b>Suelos</b>	5	5	0	4	1
<b>Vegetales</b>	8	3	5	3	5
<b>Total</b>	16	8	8	9	7

**1.1.2 Contaminación por ácaros**

En relación a la contaminación por ácaros, estuvieron presentes en 12 muestras, dos de ellas de agua (1 agua mineral con gas y 1 agua de pozo), en cultivo incubado a temperatura de 25°C, las que fueron negativas a *Acanthamoeba* spp. En 6 muestras de suelo se observaron ácaros y las 6 fueron positivas a *Acanthamoeba* spp., las 6 a temperatura de 25°C (3 suelos de río, 2 arenas y 1 suelo urbano). En 4 muestras de vegetales se encontraron ácaros, 3 a temperatura de 25°C y 1 a temperatura de 37°C. Dos de ellas fueron positivas a *Acanthamoeba* spp. a temperatura de 25°C (1 espinaca y 1 achicoria), esto se presenta en la Tabla N°6.

**TABLA N°7**

**CONTAMINACIÓN DE CULTIVOS DE *Acanthamoeba* spp. CON ÁCAROS**

Tipo de muestras	Total de muestras con ácaros	Cultivo Positivo a <i>Acanthamoeba</i> spp. con ácaros	Cultivo Negativo a <i>Acanthamoeba</i> spp. con ácaros	Cultivo a 25°C con ácaros	Cultivo a 37°C con ácaros
<b>Aguas</b>	2	0	2	2	0
<b>Suelos</b>	6	6	0	6	0
<b>Vegetales</b>	4	2	2	3	1
<b>Total</b>	12	8	4	11	1

Foto N°62



Cultivo contaminado con ácaros y hongos

Foto N°63



Cultivo contaminado con larvas

### 1.1.3 Contaminación por hongos

En la contaminación por hongos, se realizaron subcultivos a primera hora de la mañana (8:00 AM) y a última hora de la tarde (17:00 PM), hasta lograr que el crecimiento de los trofozoítos se observara antes que el crecimiento del hongo. Al lograrse esto, se cortaba el agar donde se ubicaban los trofozoítos y se transfería a una placa con medio nuevo y luego se verificaba si el crecimiento era sólo de la ameba, si esto no ocurría, se repetía el proceso hasta lograrlo, en algunos casos esto supuso prolongar los cultivos durante meses.

Foto N°64



Quistes *Acanthamoeba* spp e hifas

Foto N°65



Eliminación de hongos. Cultivo 8:00 hrs. AM  
hifas y trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

**Foto N°66**



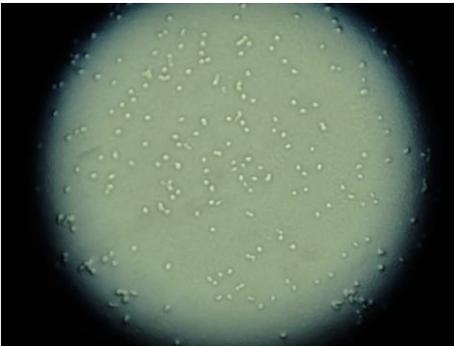
Cultivo 17:00 hrs, trofozoítos separados de las hifas

**Foto N°67**



Corte del agar en sectores sólo con trofozoítos y trasvaso a cultivo con medio nuevo

**Foto N°68**



8:00 hrs. AM crecimiento sólo de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

#### **1.1.4. Contaminación con otras AVL**

En el análisis morfológico, además de eliminar larvas, ácaros y hongos, se aisló *Acanthamoeba* spp. de otras especies de AVL de acuerdo a observación morfológica, en las fotos N° 85 a la N° 87 se muestran ejemplos de otras AVL, las que se identificarán molecularmente en un futuro estudio.

Foto N°69



Foto N°70

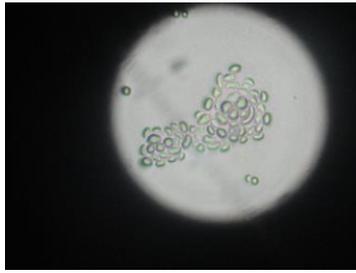
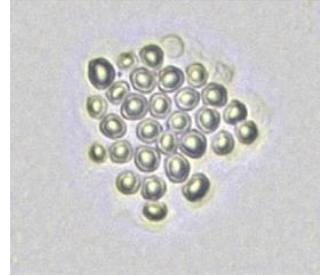


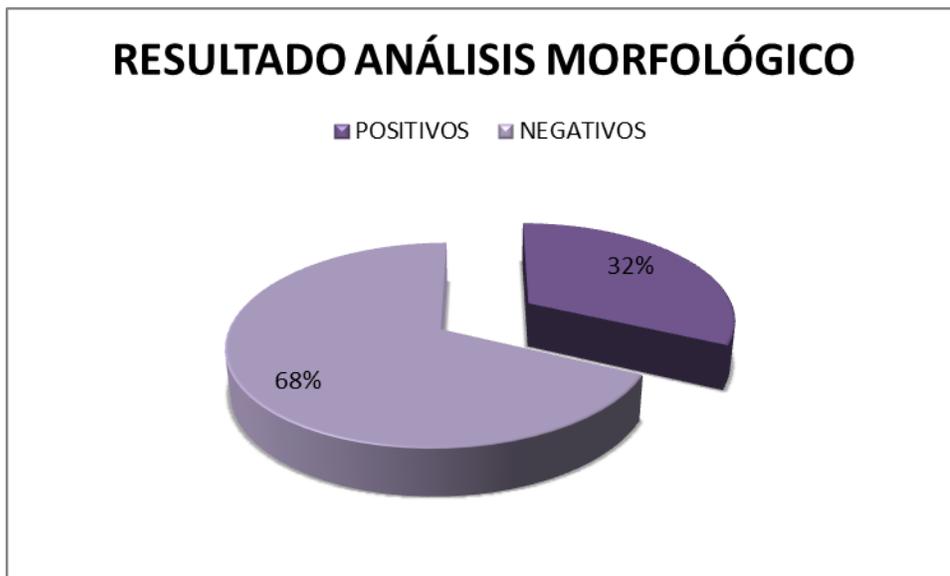
Foto N°71



## 1.2 Análisis morfológico de *Acanthamoeba* spp.

En el gráfico N°2 se observa el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en la totalidad de las muestras, el protozoo se encontró en un 32% (170/532) y en un 68% (362/532) las muestras fueron negativas.

GRÁFICO N°2



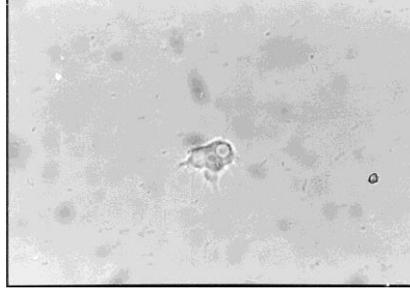
En las fotos N°72 a la N°74 se muestran trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp.

**Foto N°72**



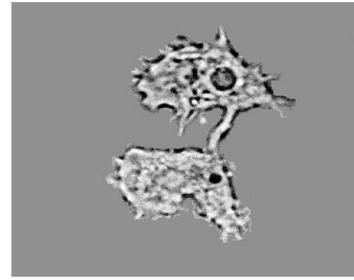
Quistes

**Foto N°73**



Trofozoíto

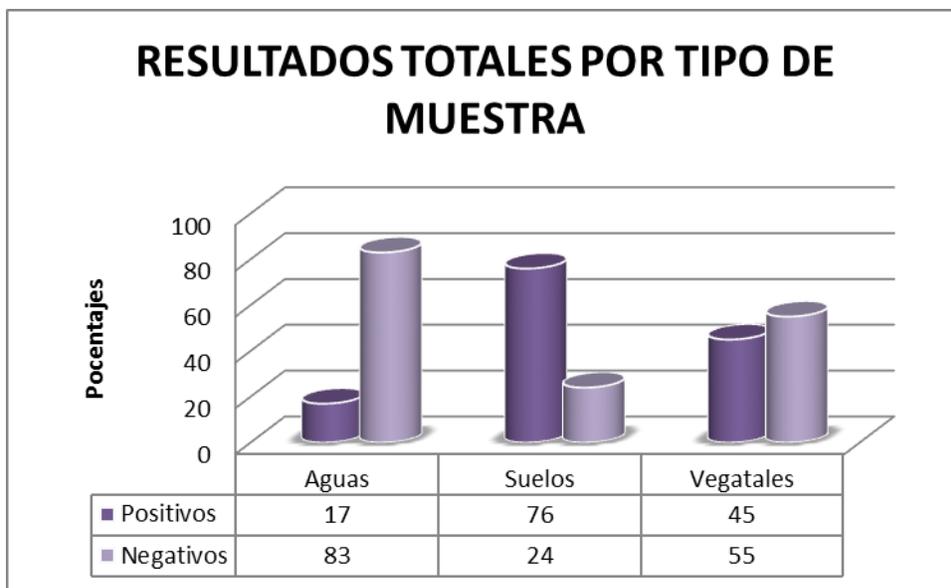
**Foto N°74**



Trofozoíto en división

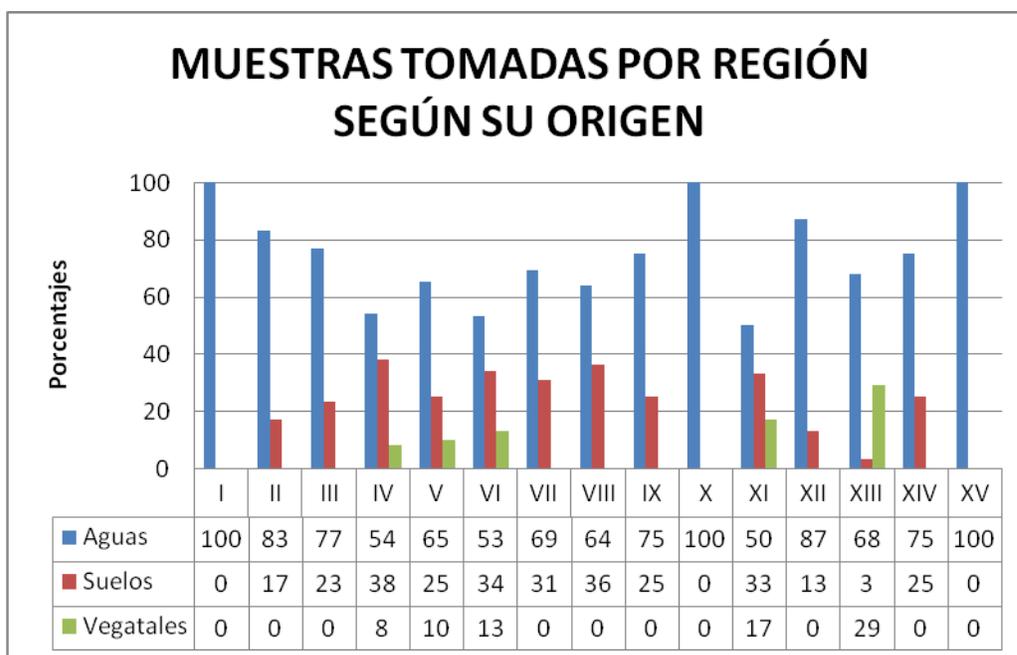
En el gráfico N° 3 se observa la distribución de muestras positivas encontradas según la muestra de procedencia. En las muestras de agua se encontró un 40% (145/362) de AVL, de las cuales, el 43% (63/145) correspondieron a *Acanthamoeba* spp. En muestras de suelos, el 83% (82/99) correspondieron a AVL, de las cuales el 91% (75/82) correspondieron a *Acanthamoeba* spp. En muestras de vegetales el 55% (39/71) correspondieron a AVL, de las cuales el 82% (32/39) se identificaron morfológicamente como *Acanthamoeba* spp. Los resultados de *Acanthamoeba* spp. en relación a los totales de las muestras según procedencia, fueron los siguientes: en las muestras de aguas se encontró una positividad de 17% (63/362), en suelo un 76% (75/99) y en vegetales un 45% (32/71), destaca el porcentaje de positividad de las muestras de suelo.

**Gráfico N°3**



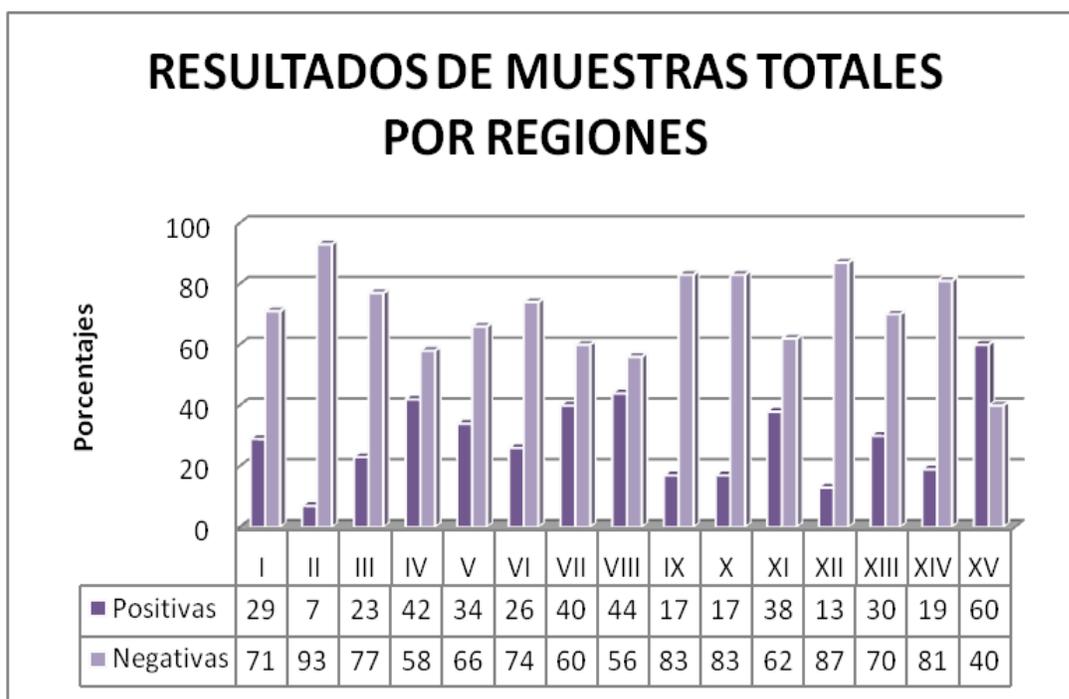
En el gráfico N°4 se observa los porcentajes de las Regiones donde se tomaron los distintos tipos de muestras, se puede ver que muestras de agua fueron analizadas en las 15 Regiones del país, las muestras de suelo en 12 Regiones y muestras de vegetales en 5 Regiones.

**Gráfico N°4**



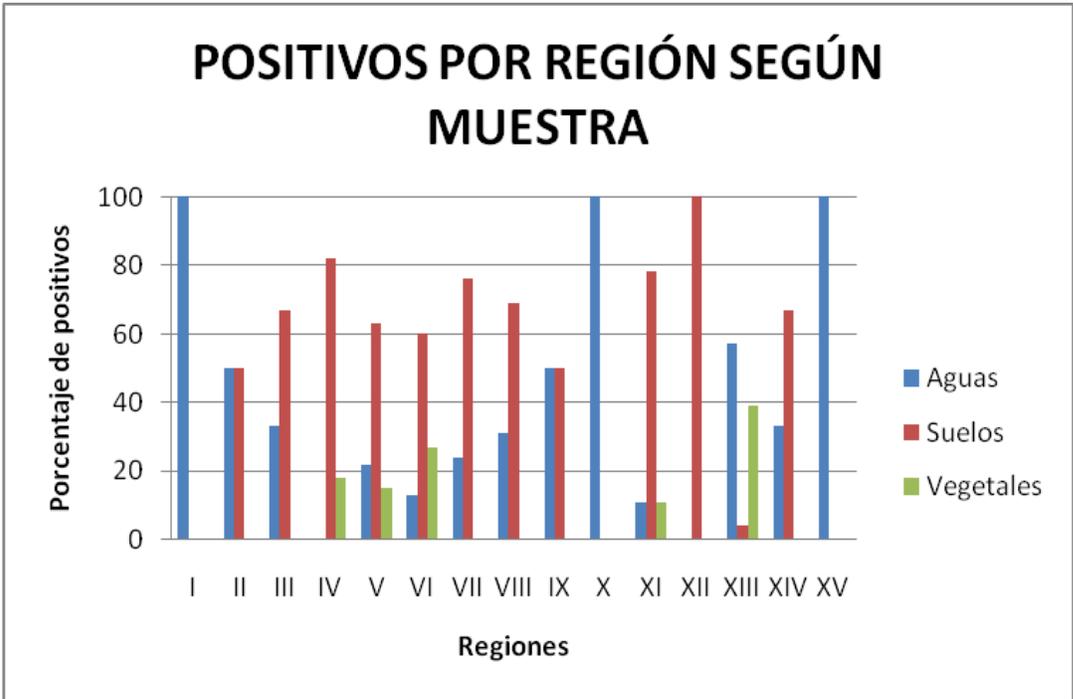
En el gráfico N° 5 se observa que en todas las Regiones se encontraron muestras positivas, los mayores porcentajes de positividad se obtuvieron en la XV Región con un 60% (6/10), seguido por la VIII Región con un 44% (16/36), la IV Región con un 42% (11/26), la VII Región con un 40% (17/42), encontrándose en la II Región el menor porcentaje de positividad, con un 7% (2/29).

**Gráfico N° 5**



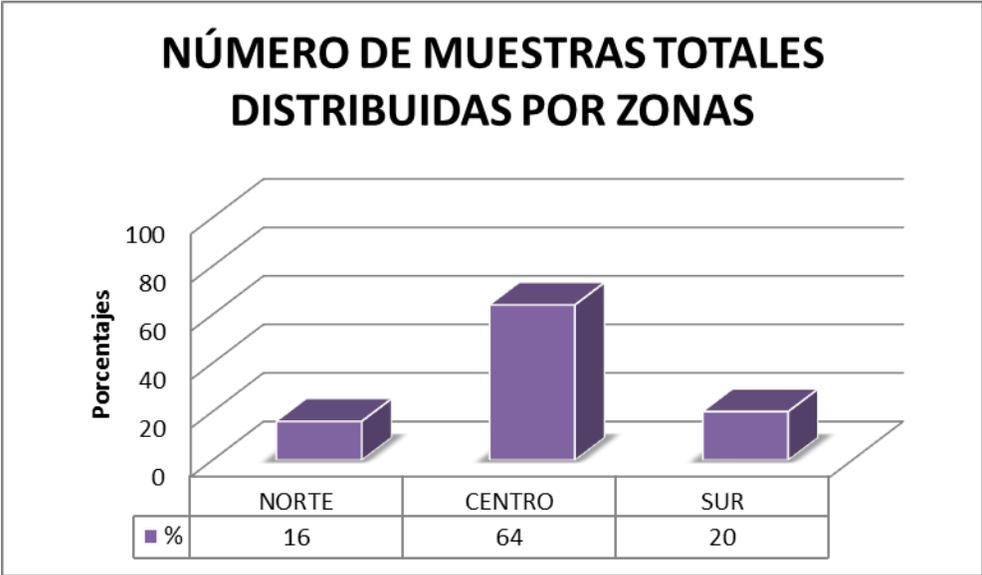
En el gráfico N° 6 se observa que en muestras de suelo se encontró positividad en las 12 regiones donde se tomaron muestras, en un rango que va de 50 a 100% de positividad, exceptuando la XIII Región con un 4%. En el caso de las muestras de agua se encontró positividad en 13 de las 15 Regiones en que se tomó muestras, los porcentajes de positividad estuvieron en un rango entre 11 al 100%. En muestras de vegetales se encontró positividad en las 5 Regiones donde se tomó muestras, en un rango de 11 a 39% de positividad.

**Gráfico N°6**



En el gráfico N°7 se observa la distribución por zonas del número total de las muestras del estudio, habiendo tomado el mayor número de muestras en la zona centro, con un 64% (339/532), seguido por la zona sur con un 20% (108/532) y un 16% (85/532) en la zona norte

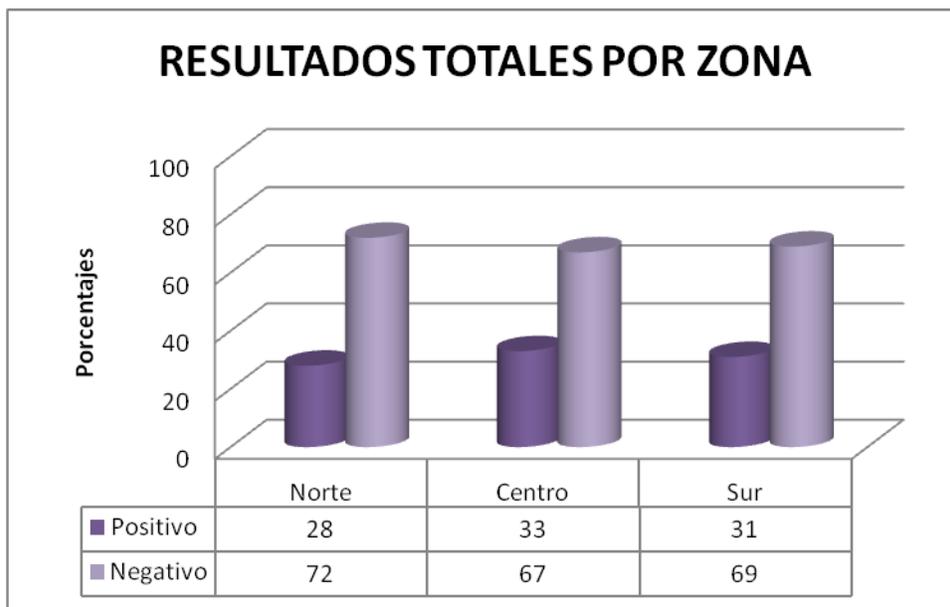
**Gráfico N°7**



En el gráfico N° 8, los resultados muestran los siguientes porcentajes de positividad: en el norte 28% (24/85), en el centro 33% (112/339) y en el sur 31% (33/108).

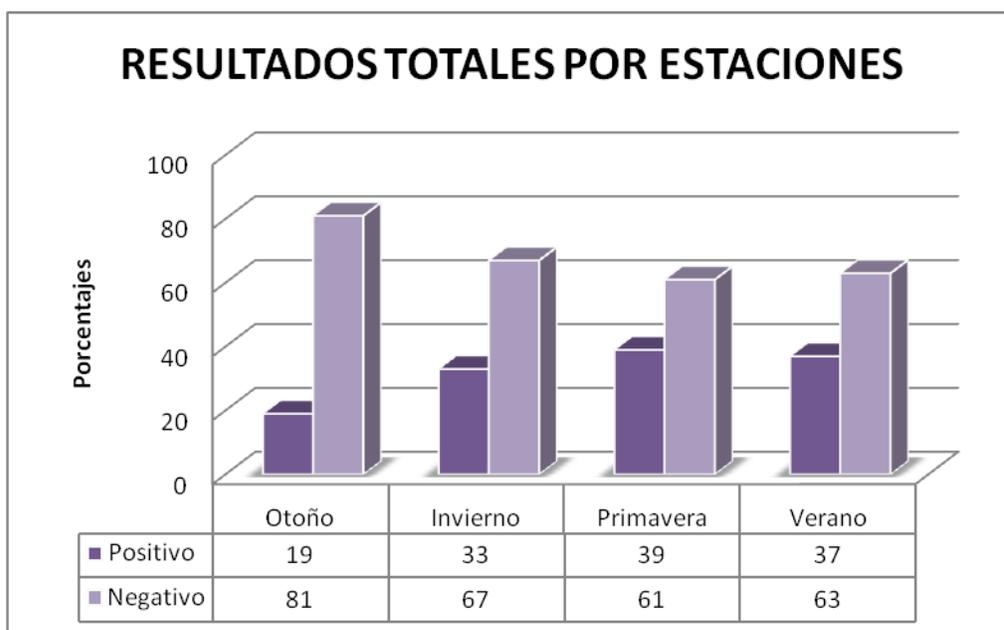
Los porcentajes de positividad de las muestras en las diferentes zonas, no muestran diferencias significativas ( $\chi^2=0,93$ ; p-valor=0,63).

**Gráfico N° 8**



En el gráfico N°9 se observa los resultados totales obtenidos con las muestras tomadas en las diferentes estaciones del año. En otoño con un 19% (25/132), Invierno con un 33% (40/120), Primavera con un 39% (44/113) y en Verano un 37% (61/167). En Otoño se observa menor positividad, resultando significativamente diferente a las observadas en las demás estaciones ( $\chi^2= 14,53$ ; p-valor=0,0023).

**Gráfico N°9**



### **RESULTADOS DE TERMOTOLERANCIA**

Todos los cultivos incubados a temperatura de 42°C fueron positivos y todos los cultivos incubados a 60°C fueron negativos.

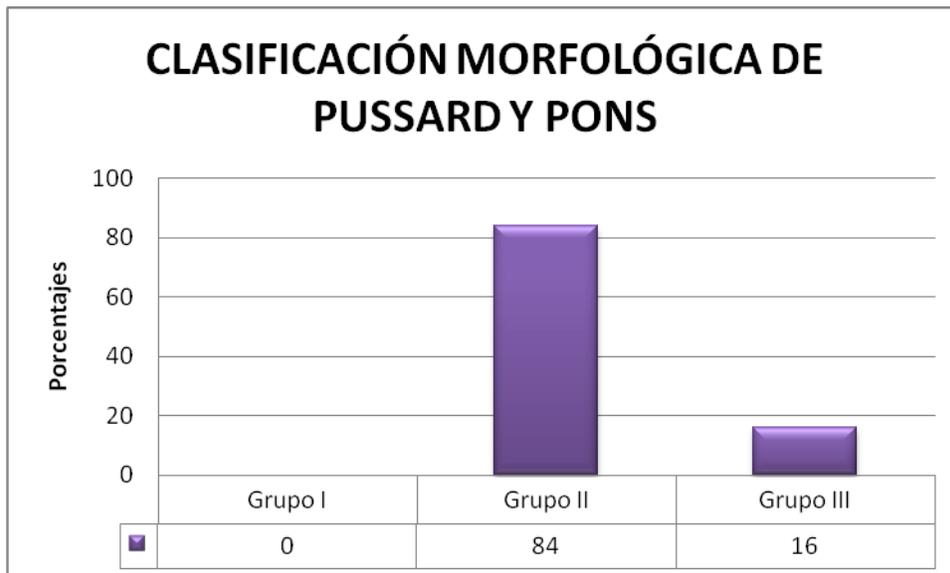
## RESULTADOS DE *Acanthamoeba* spp. DE ACUERDO A LA CLASIFICACIÓN DE PUSSARD Y PONDS.

Se tomaron más de 1700 fotografías con sus respectivas mediciones. En el producto final del aislamiento de *Acanthamoeba* spp. varias veces se encontraron mezclas de especies, en el registro de las 10 fotos con mediciones realizadas a cada muestra, se decidió que el tamaño y morfología que predominara determinaría el grupo al que pertenecería la *Acanthamoeba* spp. Las amebas pertenecientes al grupo I no predominaron en ninguna de las series de 10 fotografías, por lo tanto, sólo fueron clasificadas las *Acanthamoeba* spp. en los grupos II y III.

En relación al tamaño del total de muestras, la medición mínima encontrada correspondió a 9,44µm y la máxima a 25,5µm.

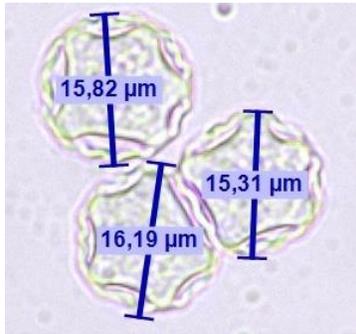
En el gráfico N°10, se observa que en el grupo II de Pussard quedaron incorporadas el 84% (142/170) de las *Acanthamoeba* spp.

**Gráfico N°10**



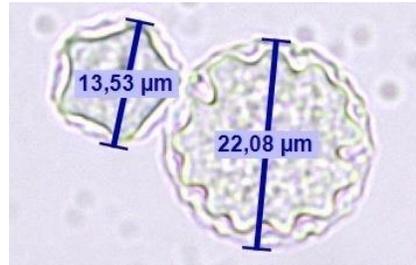
En las fotos N°75 a la 77 se puede observar quistes de *Acanthamoeba* spp. pertenecientes a los 3 Grupos de Pussard y Pons

**Foto N°75**



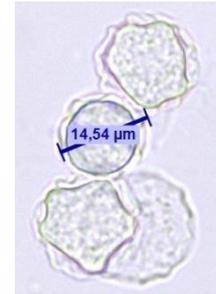
Amebas pertenecientes al Grupo II

**Foto N°76**



Amebas pertenecientes a Grupos II (13,53μm ) y. Grupo I (22,08μm)

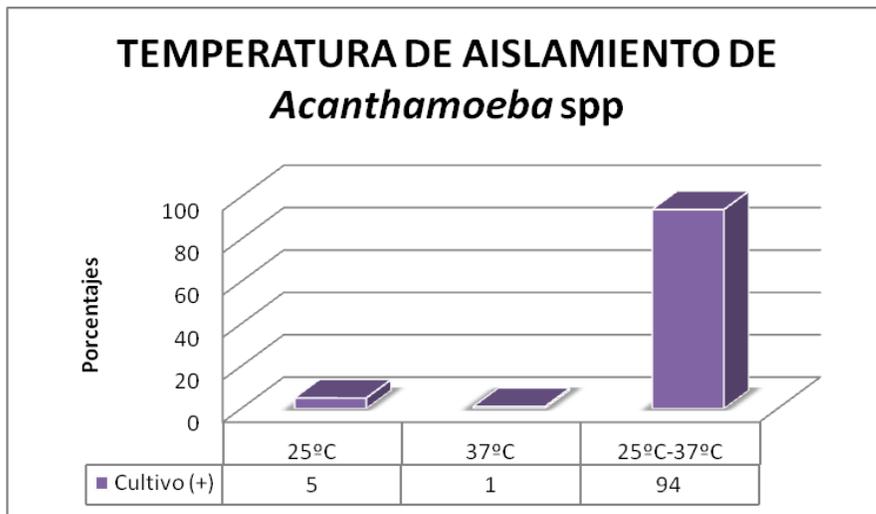
**Foto N°77**



Ameba Grupo III (14,54μm).

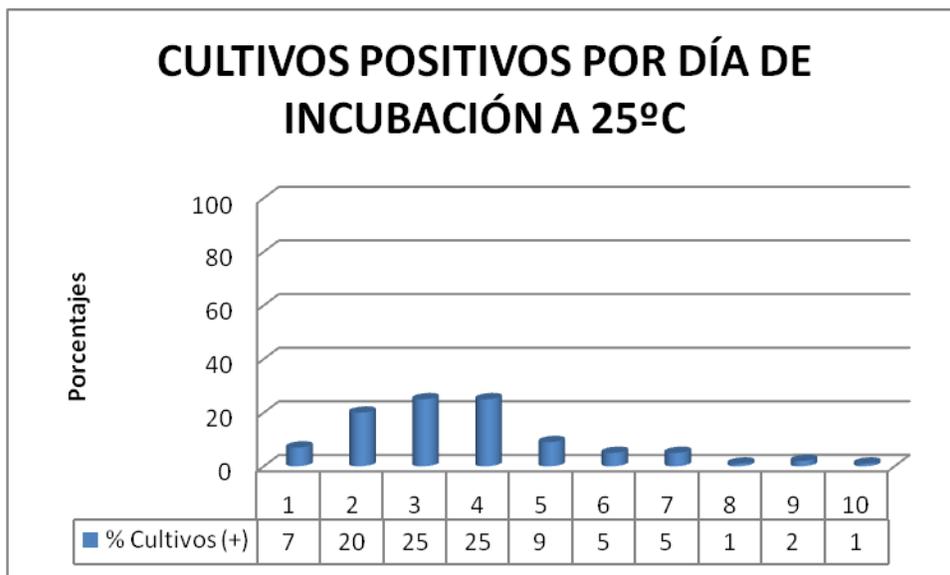
Las muestras cultivadas se incubaron simultáneamente a temperaturas de 25°C y 37°C, en el gráfico N°11 se observa que el 94% (160/170) de los aislamientos fueron positivos a ambas temperaturas, un 5% correspondieron a *Acanthamoeba* spp. aisladas a 25°C (8/170) y un 1% (2/170) sólo se aisló a 37°C.

**GRÁFICO N°11**



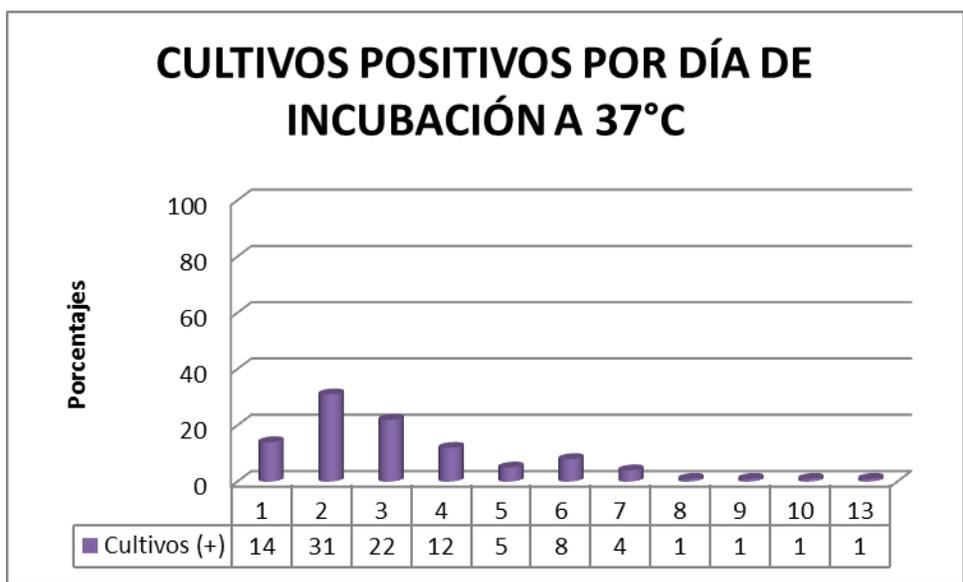
En el registro de los días en que los cultivos dieron positivo, en el gráfico N°12, se observa la positividad de los cultivos con trofozoítos y/o quistes de *Acanthamoeba* spp. en relación a los días de incubación a 25°C. La mayor positividad se obtuvo entre los 2 a 4 días de incubación con un 70% (117/168) encontrándose 1 cultivo positivo a los 10 días de incubación y 2 cultivos negativos a esta temperatura, que correspondió a 2 muestras de agua y que fueron positivas a 37°C, posteriormente estos cultivos fueron transferidos a placas con medio de cultivo nuevo e incubados a 25°C, a esta temperatura el crecimiento de las amebas fue muy lento.

**Gráfico N°12**



En el gráfico N°13 se presenta el número de cultivos positivos en relación al número de días de incubación a 37°C. En este caso la mayor positividad se obtuvo en los días 2 y 3 con 54% (87/162) Hubo 8 muestras que resultaron negativas a esta temperatura y positivas a 25°C y correspondieron a 2 muestras de arena, 2 muestras de agua y 4 muestras de vegetales. En este caso se pudo observar que 1 cultivo resultó positivo a los 13 días de incubación, este hecho ocurrió al volver a revisar la placa que por error no se eliminó en el día 10.

**Gráfico N°13**

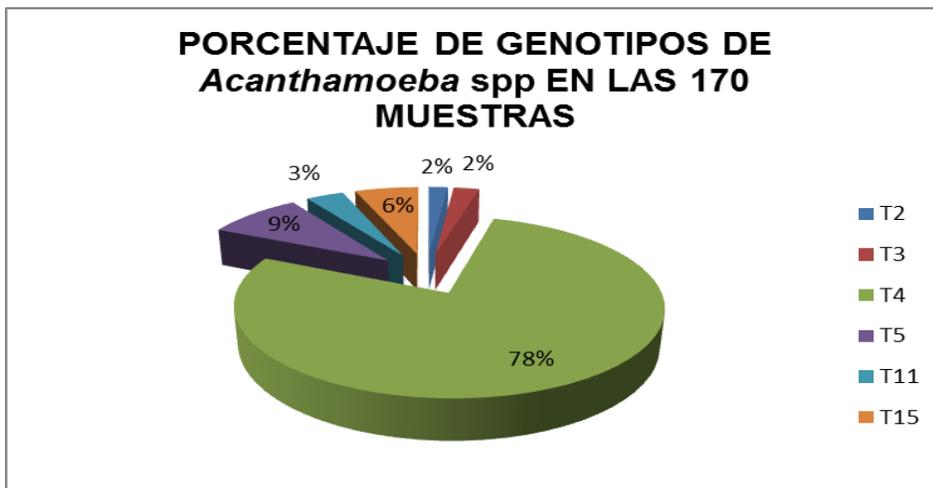


## 2. RESULTADO DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE LA TOTALIDAD DE LAS MUESTRAS

### 2. 1 GENOTIPIFICACIÓN DE *Acanthamoeba* spp.

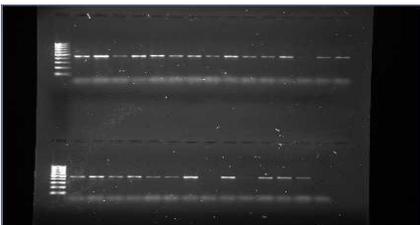
Por técnicas moleculares de PCR y secuenciación se identificaron 6 genotipos en las 170 muestras, que corresponden a los genotipos T2 y T3 con un 2% (3 y 4 muestras respectivamente), T4 con un 78% (132), T5 con un 9% (15), T11 con un 3% (6) y T15 con un 6% (10). Destaca el predominio del genotipo T4 con un 78%, seguido a una gran distancia por el genotipo T5 (9%) y en tercer lugar el genotipo T15 (6%), lo que se muestra en el gráfico N°14

Gráfico N°14



En la Foto N°64 se observa un gel de agarosa con un marcador de peso molecular, controles positivo, negativo y muestras positivas a *Acanthamoeba* spp.

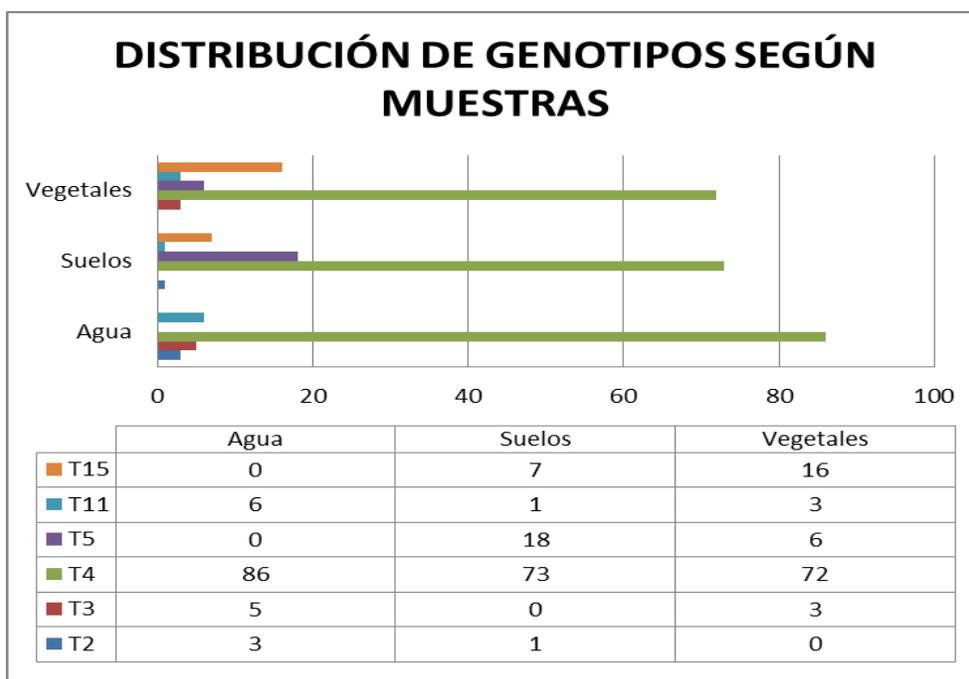
Foto N°78



En el gráfico N°15 se observa que en los tres tipos de muestras se identificaron los genotipos T4 y T11. El genotipo predominante fue T4, que en las 63 muestras de agua se encontró en un 86% (54), en las 75 muestras de suelo en el 73% (55) y en las 32 muestras de vegetales en un 72% (23). En aguas, el genotipo que le sigue en frecuencia es el T11 con un 6% (4), en muestras de suelo el segundo corresponde al genotipo T5 con un 18% (13) y en el caso de los vegetales fue el T15 con un 16% (10).

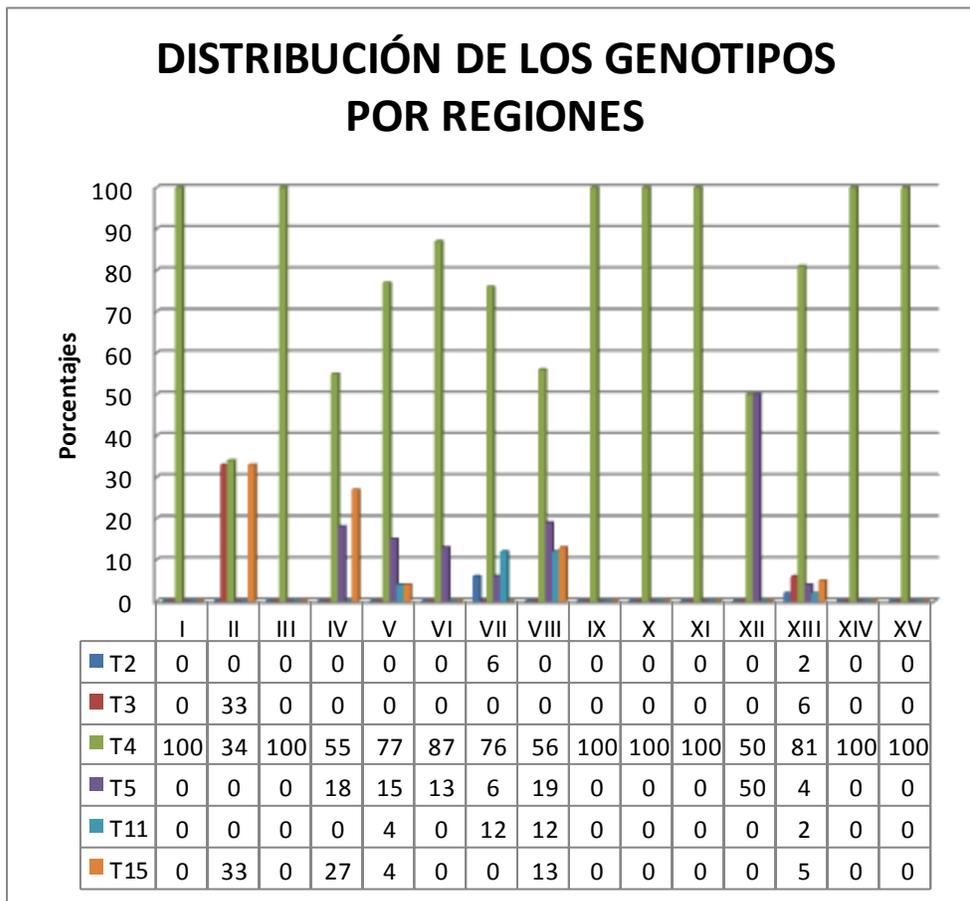
Se evaluaron las asociaciones entre tipos de muestras y genotipo aislado a través de la prueba estadística de Chi-cuadrado, resultando las mismas significativas (p-valor 0,0013). El genotipo T5 se halla fuertemente asociado con suelo y genotipo T15 con vegetales. En el caso de T11 se halla de manera más frecuente en aguas. El genotipo T4 se distribuye de manera homogénea en los 3 tipos de muestras, observándose el predominio de este genotipo en todas ellas.

**Gráfico N°15**



En el gráfico N°16 se confirma el predominio del genotipo T4, identificándose en todas las Regiones en un rango entre el 34 al 100%, seguido por el genotipo T5 en 7 Regiones, luego el genotipo T15 en 5 Regiones, seguido por el genotipo T11 en 4 Regiones, genotipos T2 y T3 en 2 Regiones.

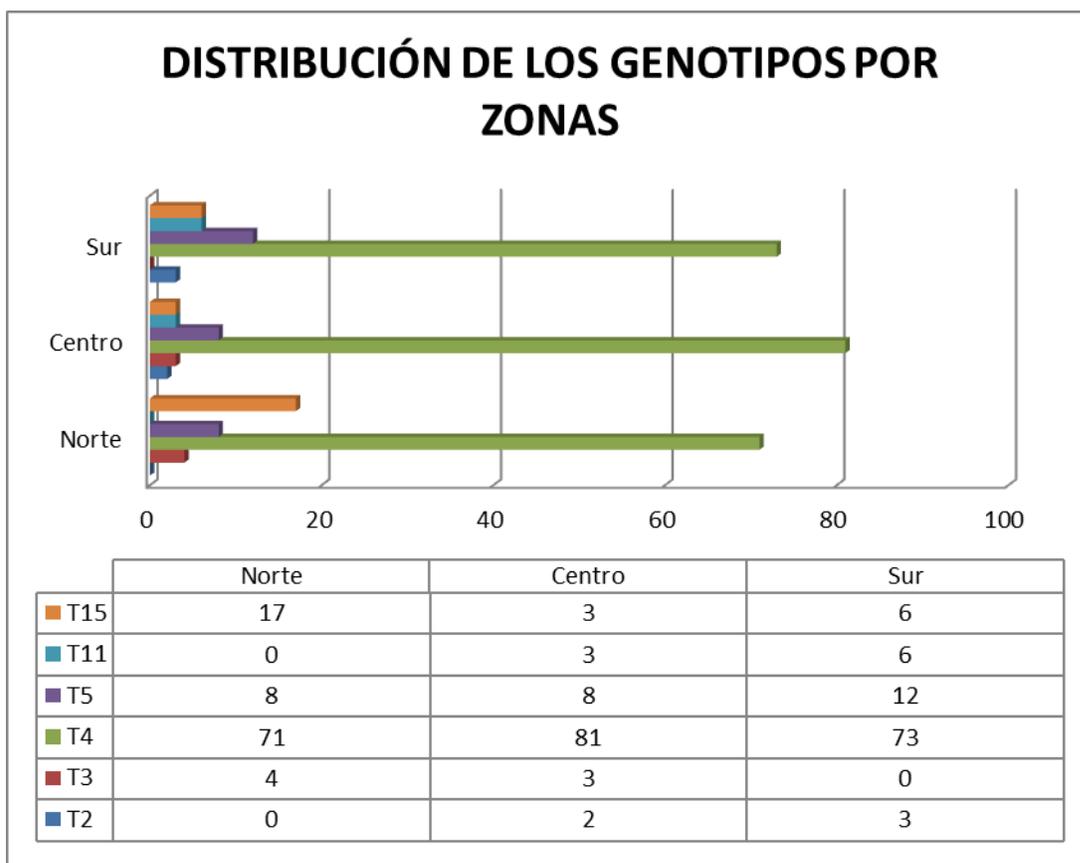
**Gráfico N°16**



En el gráfico N°17 se observa nuevamente que los mayores porcentajes en las zona norte, centro y sur corresponden al genotipo T4 con un 71% (17/24) en el norte, 81% (91/113) en el centro y 73% (24/33) en el sur. Junto al genotipo T4, los genotipos T5 y T15 se identificaron en las 3 zonas.

Aunque se observa que el genotipo T15 es más frecuente en el Norte y que T5 es más frecuente en el sur, al aplicar la prueba de chi- cuadrado, no se hallaron asociaciones significativas (p-valor 0,44) entre Zonas y Genotipos encontrados.

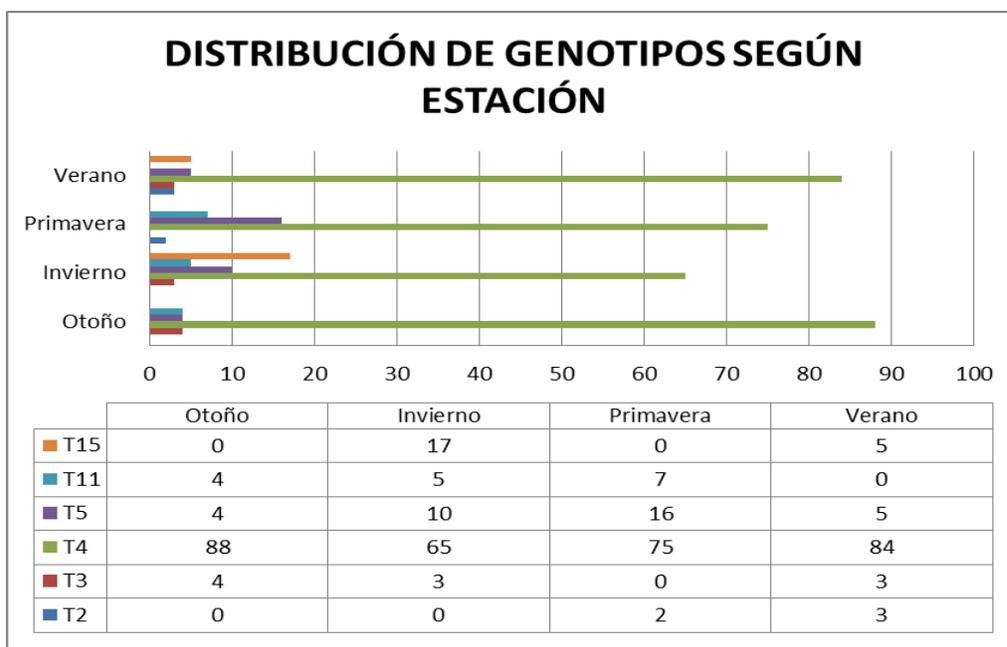
**Gráfico N°17**



En el gráfico N°18 se observa que el genotipo predominante fue T4 sin importar la estación. Los genotipos T4 y T5 se encuentran en todas las estaciones. En el genotipo T4 el mayor porcentaje de aislamiento 88% (22/25) se obtuvo en otoño, seguido por el verano con un 84% (51/61), luego en primavera con 75% (33/44) y en invierno con un 65% (26/40). En el caso del genotipo T5 el mayor porcentaje se obtuvo en primavera con un 16% (7/44), luego invierno con un 10% (4/40), seguido por el verano con un 5% (3/61), terminando con el otoño con un 4% (1/25). El genotipo T2 en el verano con un 3% (2/61) y en primavera con un 2% (1/44). El genotipo T3 se identificó en el verano con un 3% (2/61), en el invierno con un 3% (1/40) y el otoño con un 4% (1/25). El genotipo T11 se identificó en primavera con un 7% (3/44), en invierno con un 5% (2/40) y en otoño con un 4% (1/25). El genotipo T15 se identificó en invierno con 17% (7/40) y en el verano con un 5% (3/61).

No es posible realizar análisis estadístico de asociaciones, porque algunos genotipos no han aparecido y otros presentan bajas frecuencias.

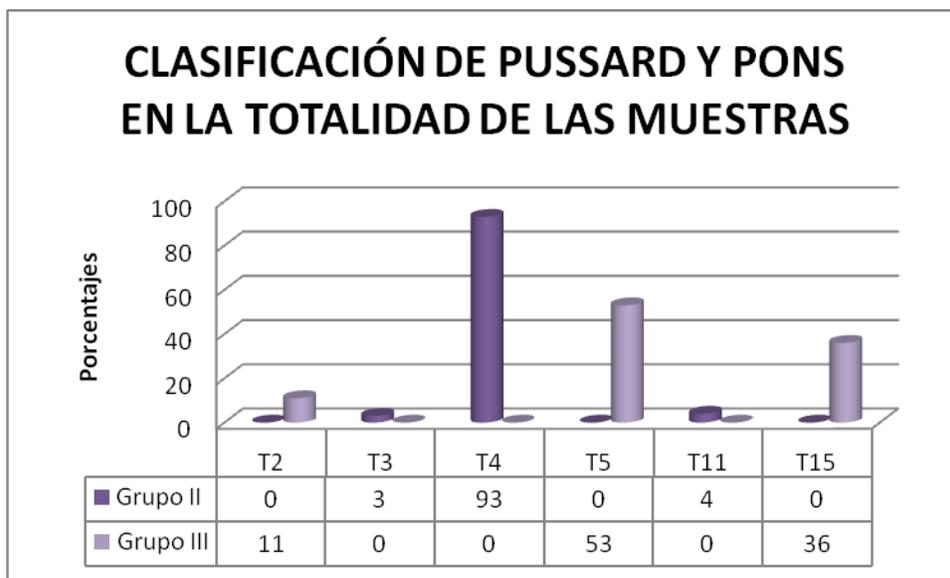
**Gráfico N°18**



En el gráfico N°19 se observa que en el Grupo II de Pussard y Pons el genotipo predominante fue T4, con un 93% (132/142), seguido por T11 con un 4% (6/142) y T3 con un 3% (4/142). En el Grupo III el mayor porcentaje lo obtuvo el genotipo T5 con un 53% (15/28), seguido por el genotipo T15 con un 36% y luego el genotipo T2 con un 11% (3/28).

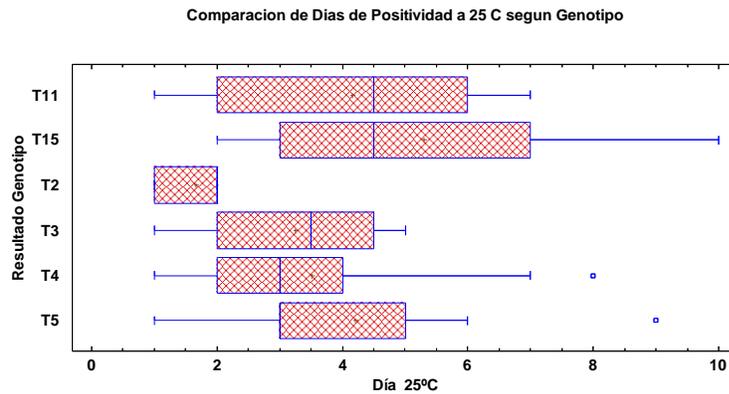
Se observa asociación significativa (chi-cuadrado= 170, p-valor < 0,00001) entre el genotipo y los Grupos de Poussard y Pons estando el genotipo T4 asociado al Grupo II, mientras que los genotipos T5 y T15 están asociados al Grupo III.

**Gráfico N°19**



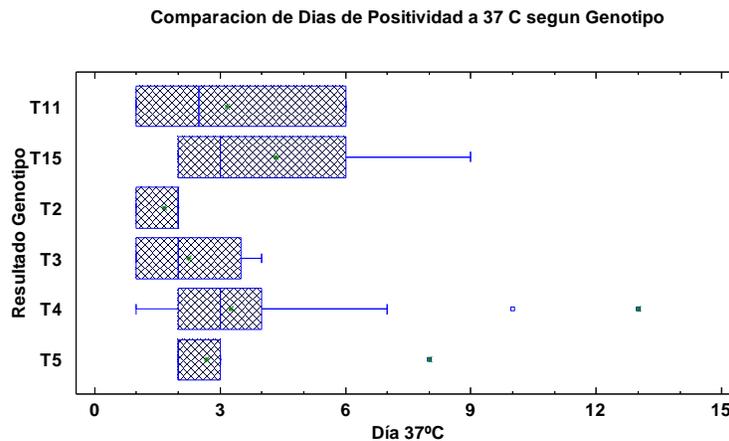
Se compararon los tiempos que tardaron en crecer los diferentes genotipos a 25°C. En el gráfico N°20, si bien las muestras con genotipo T2 mostraron un tiempo de crecimiento menor (mediana=2) al realizar la comparación de los “días de incubación a 25°C” según los diferentes genotipos encontrados, la prueba de Kruskal-Wallis=10,1 resultó no significativa (K-W=10,1; p-valor=0,07), indicando que no hay evidencias estadísticas para decir que hay diferencias en los días de incubación a 25°C.

**Gráfico N°20**



En el Gráfico N°21, se compararon los tiempos que tardaron en crecer los diferentes Genotipos a 37°C. Al realizar la comparación de los “Días de Incubación a 37°C” según los diferentes “Genotipos” encontrados, la Prueba de Kruskal-Wallis, resultó no significativa ( $K-W=7,48$ ;  $p\text{-valor}= 0,18$ ), indicando que no hay evidencias estadísticas para decir que hay diferencia en los días de Incubación a 37°C.

## Gráfico N°21



## Muestras tomadas simultáneamente

De las muestras que se tomaron simultáneamente, en el mismo lugar y día, hubo 82 binomios, de muestras de agua y suelo. Los resultados mostraron sólo 6 coincidencias y todas correspondieron a genotipo T4. En 3 binomios agua-suelo, cuyos genotipos no fueron coincidentes se obtuvieron los siguientes resultados:

Binomio 1: Agua genotipo T11 y suelo genotipo T4

Binomio 1: Agua genotipo T4 y suelo Genotipo T5

Binomio 3: Agua genotipo T11 y suelo genotipo T5.

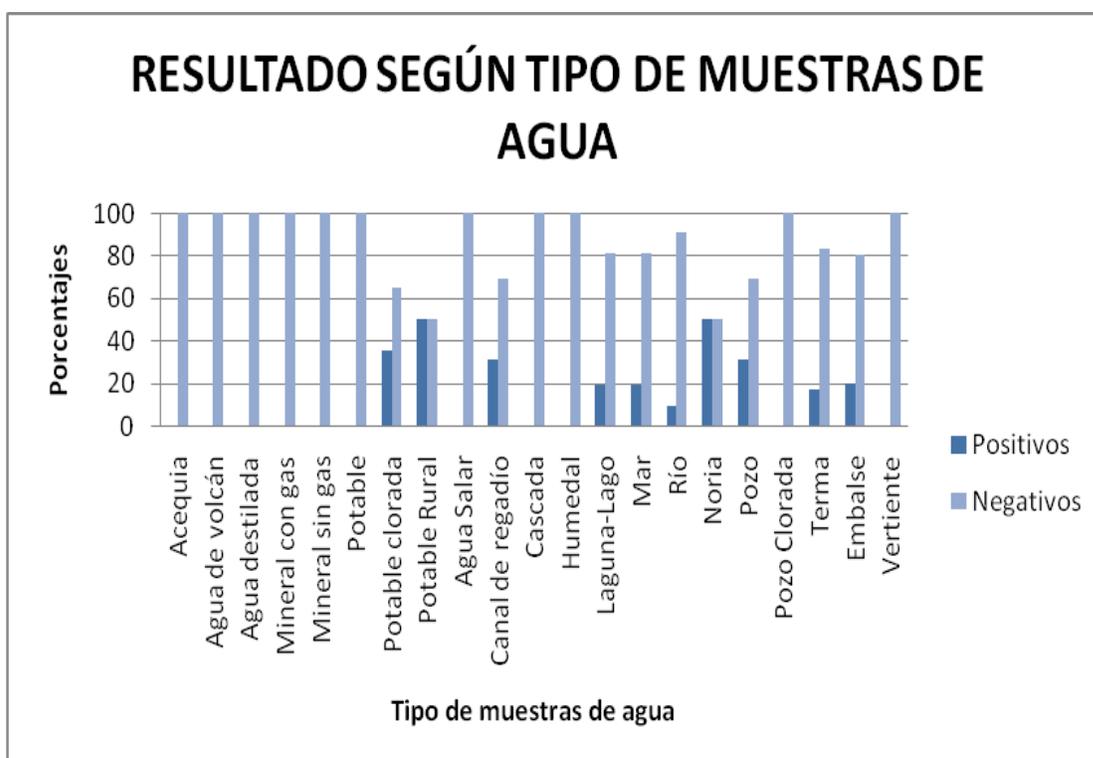
## B. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE AGUAS

### 1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE AGUA

#### 1. 1 Resultados de acuerdo a tipo de muestras de agua

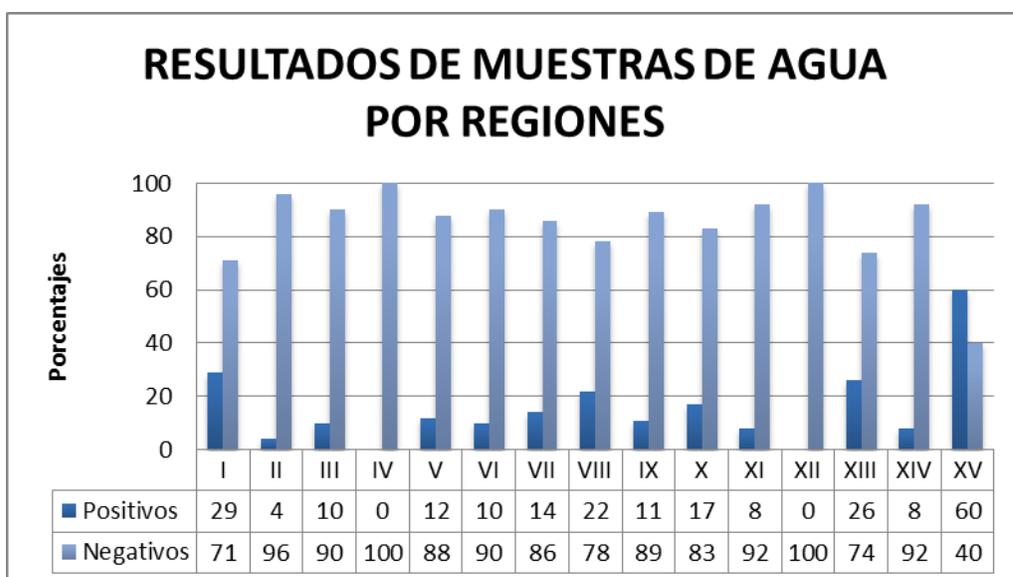
En el gráfico N°22, la mayor frecuencia de positividad se obtuvo con las muestras de agua potable rural (1/2) y agua de noria (1/2) con un 50 % cada una, agua potable clorada (piscinas) con un 35% (27/78), seguido por canal de regadío (11/35) y agua de pozo (4/13) con un 31% cada una, agua de pozo con un 20% (1/5), Agua de laguna-lago (3/16) y agua de mar (11/58) con un 19%, agua de terma con un 17% (1/6) y agua de río con un 9% (3/33). Las muestras de agua potable (72/72) mineral con y sin gas (13-7 respectivamente), pozo clorada (8/8), destilada (4/4), cascada (3/3), humedal (2/2), vertiente (2/2), de acequia (1/1), volcán (1/1) y salar (1/1), resultaron negativas.

Gráfico N°22



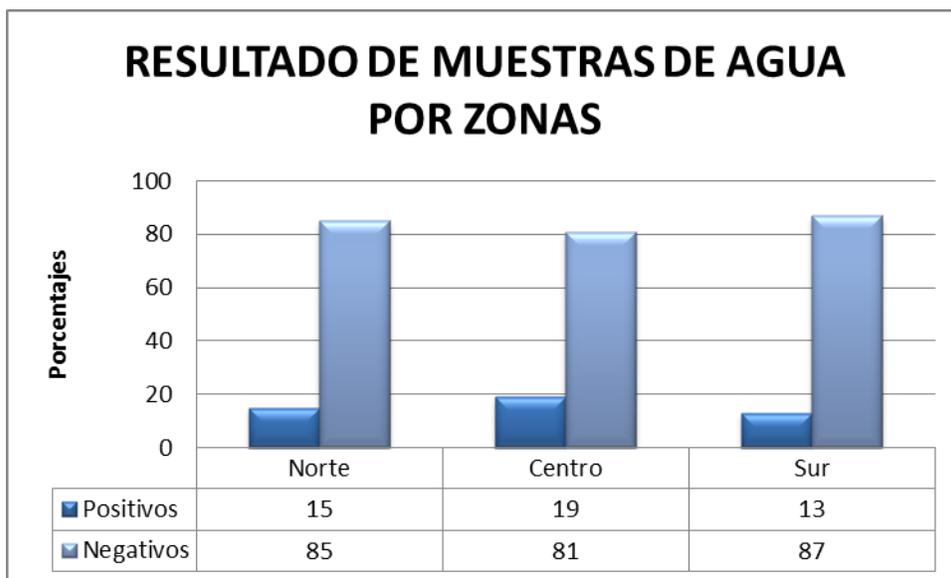
En el gráfico N°23, se muestra la distribución de los resultados por Regiones, en las muestras de agua se tomaron en todas las Regiones, en dos de ellas, las Regiones IV y XII no se encontraron muestras positivas. Se puede observar que la mayor positividad se encontró en la XV Región con un 60% (6/10), en la I Región un 29% (2/7), en la XIII un 26% (31/121), en la VIII Región con un 22% (5/23), la X Región con un 17% (2/12), la menor positividad estuvo en la II Región con un 4% (1/24).

**Gráfico N°23**



En el gráfico N° 24, se observa la distribución de las muestras de agua por zona, los resultados se presentan en este gráfico, en el cual se observa que se encontró 63 muestras de agua con *Acanthamoeba* spp. y es la zona centro la que muestra la mayor positividad con un 19% (43/222), zona norte con un 15% (10/65) y zona sur con 13% (10/75).

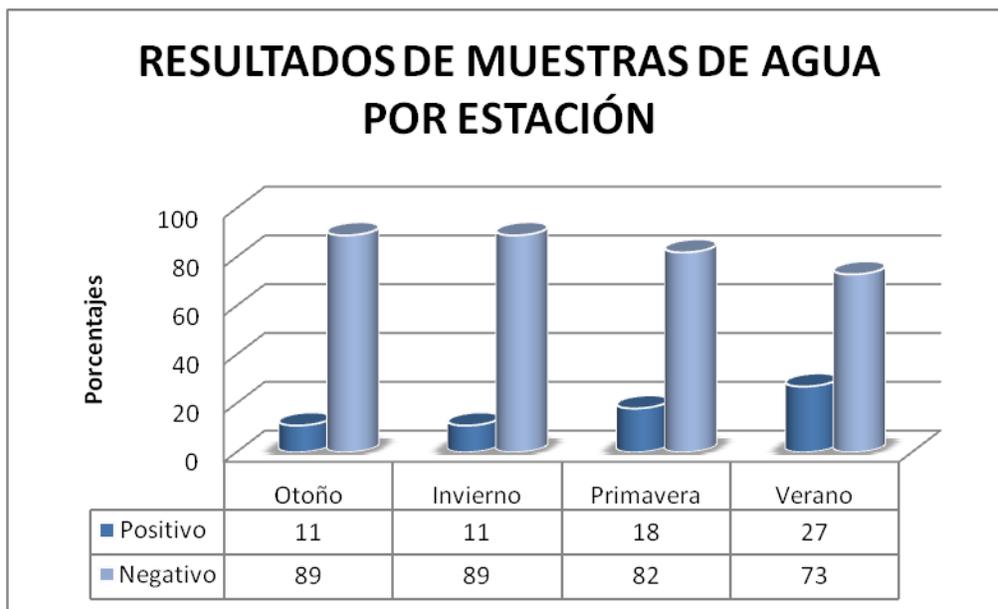
**Gráfico N°24**



En el gráfico N°25 se presentan los resultados de las muestras de agua por estaciones, en el cual se observa que el mayor porcentaje de muestras positivas se identificaron en verano, con un 27% (31/115), seguido en primavera con un 18% (12/66) y otoño de 11% (12/108) y en invierno con 11% (8/73).

En las muestras de agua se observaron mayores proporciones de positividad durante los meses de verano, resultando significativas las diferencias halladas con la primavera, otoño e invierno ( $\chi^2=12,41$ ; p-valor= 0,0061)

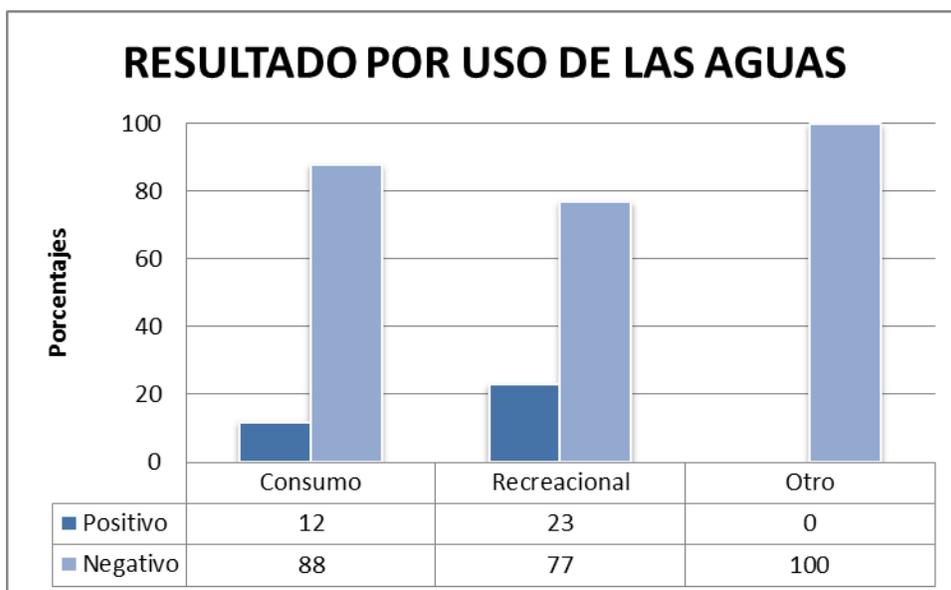
**Gráfico N°25**



En relación a los resultados obtenidos de las muestras de agua de acuerdo a su uso, en el gráfico N°26, se puede observar que las aguas recreacionales (piscinas, ríos, lagunas, mar, termas), representan el mayor número con 195, de las cuales resultaron positivas 23% (45/195), el segundo grupo correspondió a aguas de consumo con 153 muestras: (potable, potable rural, canal de regadío, noria, acequias, vertiente, pozo, pozo clorada, embalse, mineral con y sin gas) resultando positivas 12% (18/153) y el tercer grupo correspondió a muestras que no clasificaron en los grupos anteriores y fueron 14, en el que no hubo muestras positivas.

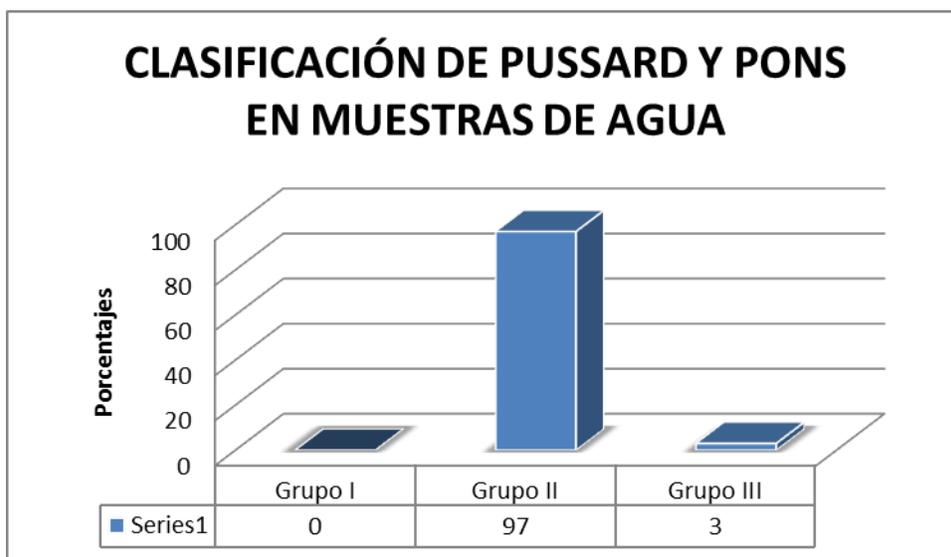
Se observaron asociaciones significativas entre el uso de las aguas y la positividad ( $\chi^2=10,7$ ; p-valor=0,0047), sin embargo, el resultado de la prueba estadística puede no ser válida al no encontrarse muestras positivas en “otro”.

**Gráfico N°26**



En el gráfico N°27, se observa que en las muestras de aguas, al grupo II pertenecieron un 97% (61/63) *Acanthamoeba* spp. (97%) y al grupo III un 3% (2/63).

**Gráfico N°27**



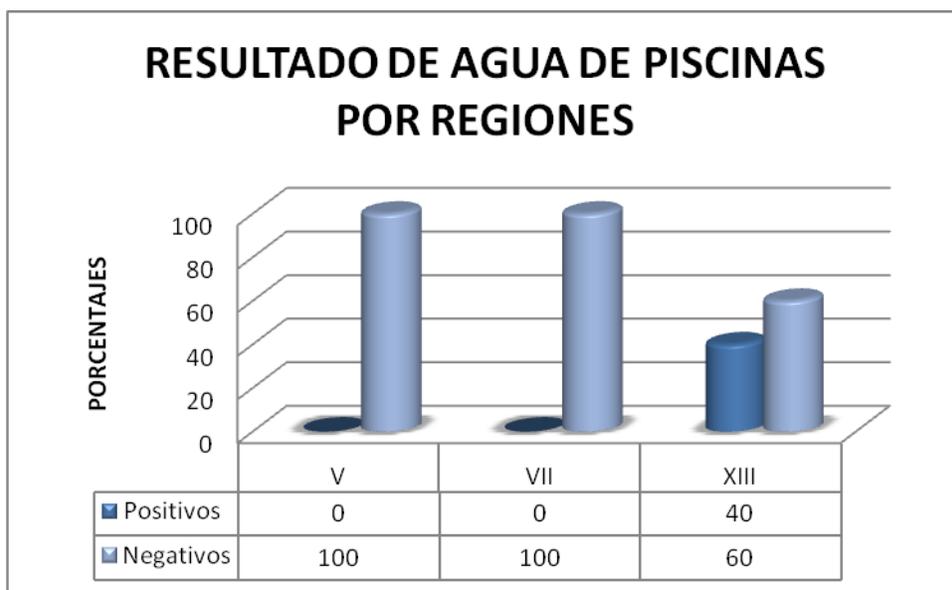
### **Resultado de análisis de agua de piscinas**

El tipo de agua que contenían las piscinas fue de 78 con agua potable clorada, 3 con agua de mar (V región) y 1 con agua de pozo clorada (XIII región). En las visitas de inspección realizadas por los inspectores del SEREMI de Salud de la Región Metropolitana, notifican el cumplimiento o no de la normativa descrita en el Reglamento de piscinas de uso público, Decreto N°209, con modificaciones del decreto 43/06, MINSAL. El pH debe estar en el rango entre 7,2 a 8,2, el cloro libre residual 0,5 a 1,5 ppm, bacterias aeróbicas  $\leq 200$  colonias/ml, ausencia de coliformes fecales, coliformes totales  $\leq 20$  colonias/100 ml, entre otros parámetros.

En el gráfico N°28, se observa que las 82 piscinas incluidas en el estudio fueron mayoritariamente de la Región Metropolitana (RM) 83% (68/82), 16% (13/82) de la V Región y 1% (1/82) de la VII. Todas las piscinas que resultaron positivas pertenecían a la RM, con un 33% (27/82).

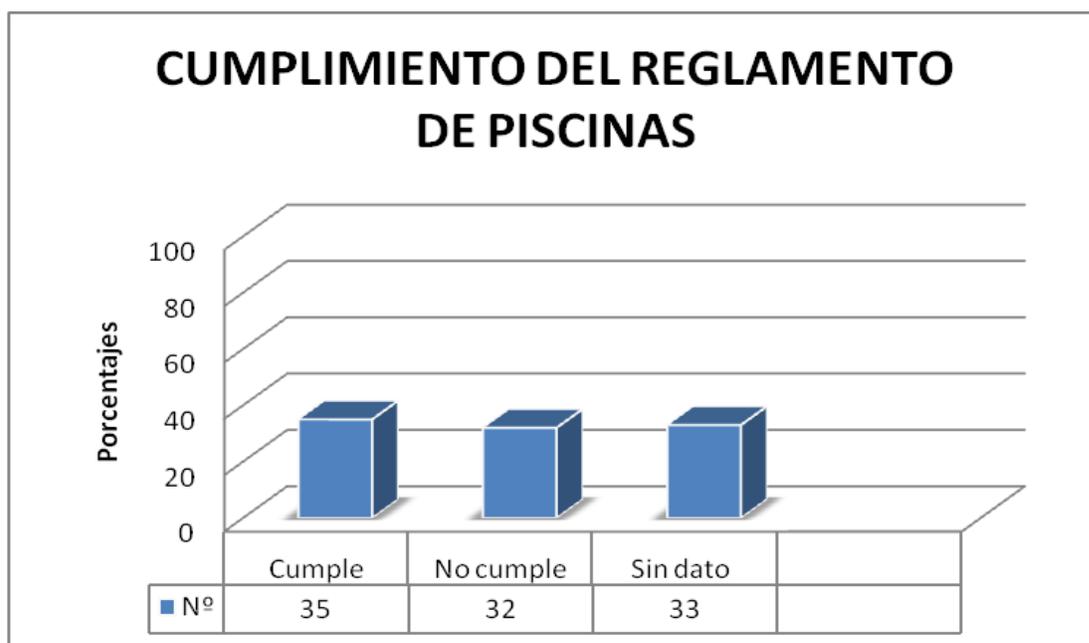
En relación al cumplimiento del reglamento de piscinas, Decreto N°209, fueron 55 las piscinas que tenían registro de las visitas de inspección realizadas por los inspectores de Salud Ambiental de los SEREMI con el fin de verificar el cumplimiento del Decreto N°209, las piscinas sin datos de haber sido controladas por los inspectores correspondieron a 27 que fueron tomadas en forma particular, algunas que no estaban en funcionamiento en el momento de la inspección y que fueron tomadas las muestras de agua posteriormente.

**Gráfico N°28**



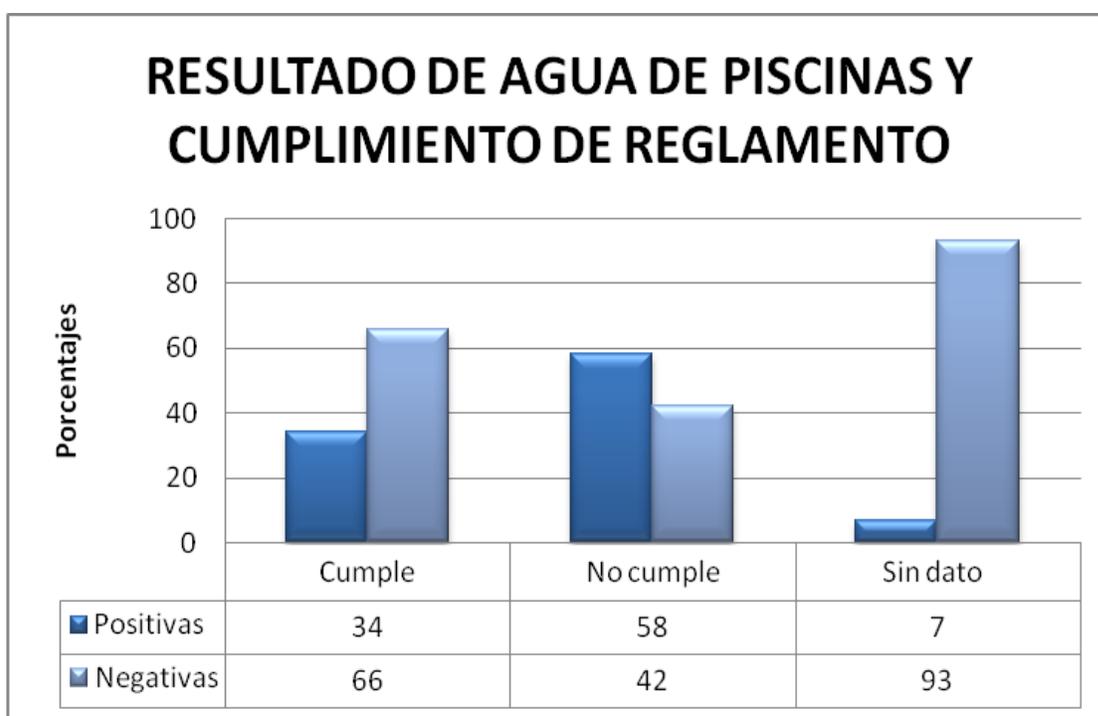
En el gráfico N°29 se presenta el número total de las piscinas del estudio, las que no tuvieron inspección y las inspeccionadas que cumplían el reglamento que fueron 53% (29/55).

**Gráfico N°29**



En el gráfico N°30 se presentan los resultados que se obtuvieron con las piscinas inspeccionadas y no inspeccionadas y las que cumplían o no el Decreto N°209. Dos de las piscinas no inspeccionadas resultaron positivas (7%), de las inspeccionadas que cumplían el reglamento 34% (10/29) y las que no cumplían el reglamento 58% (15/26) fueron positivas, resultando significativas las diferencias en las proporciones de positividad ( $\chi^2= 15,1$ ; p-valor=0,0005).

**Gráfico N°30**



## Termotolerancia a 42°C en muestras de aguas

En relación a las muestras de agua, se muestran como ejemplo 4 fotos donde se puede observar el crecimiento de *Acanthamoeba* spp. A las 24 horas de incubación la placa con el cultivo se observaba al microscopio y se marcaba con rojo el crecimiento de la ameba, en el 2º día si había aumentado el crecimiento de la ameba, se marcaba con azul, el tercer día con verde y el 4º día con negro. Se observa que en la foto N°79 de la muestra N°17 en el tercer día el crecimiento de la ameba cubrió toda la placa, en la foto N81, en la muestra N°108 el crecimiento fue parcial (menos del total de crecimiento de la superficie de la placa de cultivo) y en la foto N°82, la muestra N°313 sólo hubo crecimiento hasta las 24 hrs.

## Crecimiento de *Acanthamoeba* a 42°C

Foto N°79

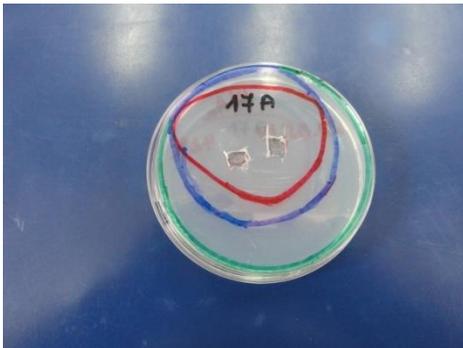


Foto N°80



Foto N°81

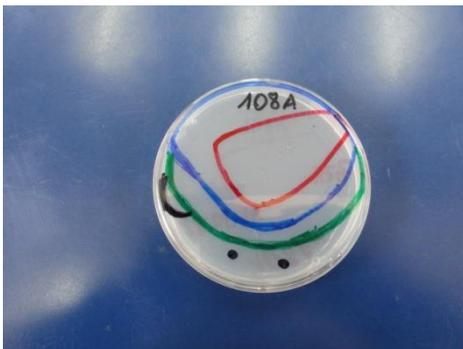
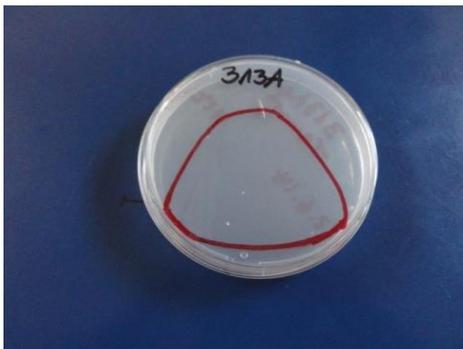


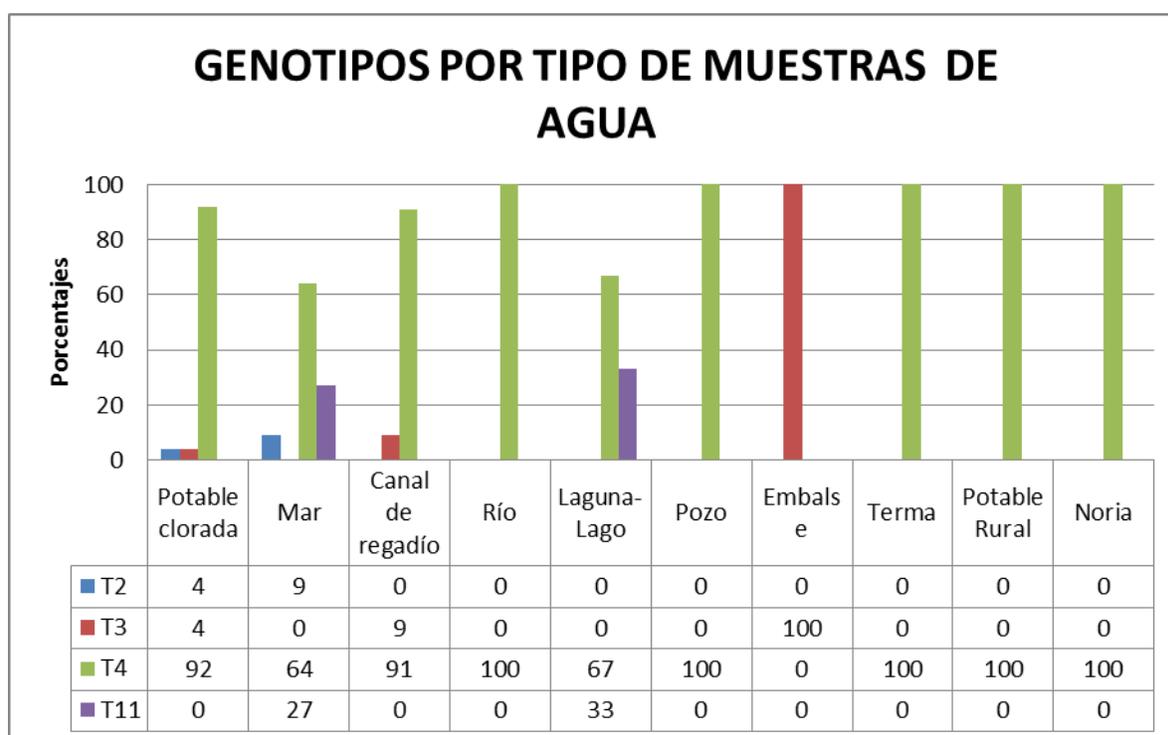
Foto N°82



## 2. RESULTADO DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE AGUAS

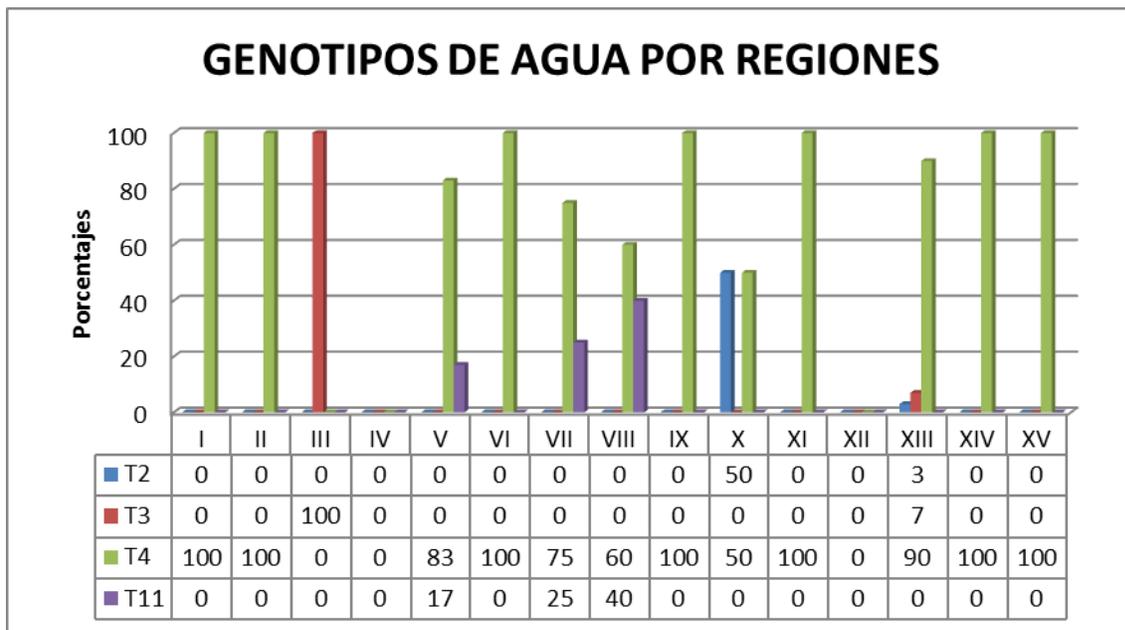
En el gráfico N°31, relacionado con los genotipos en los diferentes tipos de muestras, se observa que en las muestras de agua se encontraron los genotipos T2, T3, T4 y T11. El genotipo T4 se encuentra en todos los tipos de agua, excepto en agua de embalse, en rangos que van entre 64 al 100%. El genotipo T3 se encontró en agua potable clorada, canal de regadío y agua de embalse. El genotipo T2 se identificó en agua potable clorada y en agua de mar. El genotipo T11 se encontró en agua de mar y en agua de laguna-lago.

Gráfico N°31



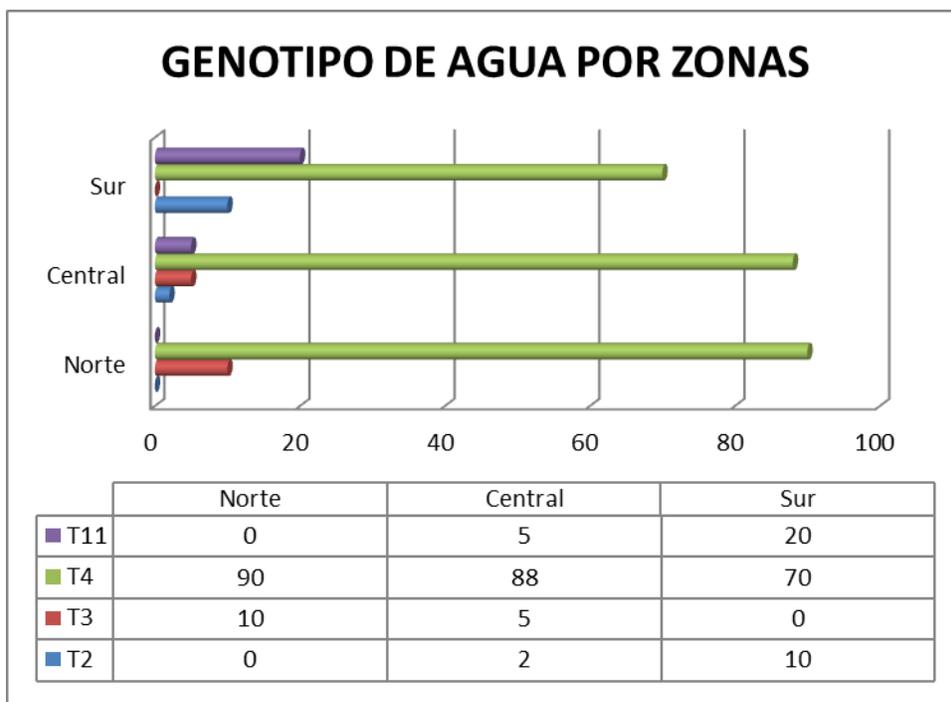
En el gráfico N°32, se observa el genotipo T4 en 12 Regiones, entre el 50 al 100% de positividad. El genotipo T2 se encontró en las Regiones X y XIII con un 50% y 3% respectivamente. El genotipo T3 se encuentra en la III Región en un 100% y un 7% de positividad en la XIII Región. El genotipo T11 se identificó en la V Región con un 17%, en la VII un 25% y en la VIII un 40%.

**Gráfico N°32**



En el gráfico N°33 se observa la distribución de los genotipos por zonas del país. En el norte se encontró 9 muestras positivas el genotipo T4 en 90% (9/10) y el genotipo T3 en un 10% (1/10). En la zona centro se encontró 43 muestras positivas el genotipo T4 en un 88% (38/43), los genotipos T3 (2/43) y T11 (2/43) con un 5% y el genotipo T2 con un 2% (1/43). En la zona sur se identificó genotipos en 10 muestras positivas, el genotipo T4 en un 70% (7/10), el genotipo T11 en un 20% (2/10) y genotipo T2 con un 10% (1/10)

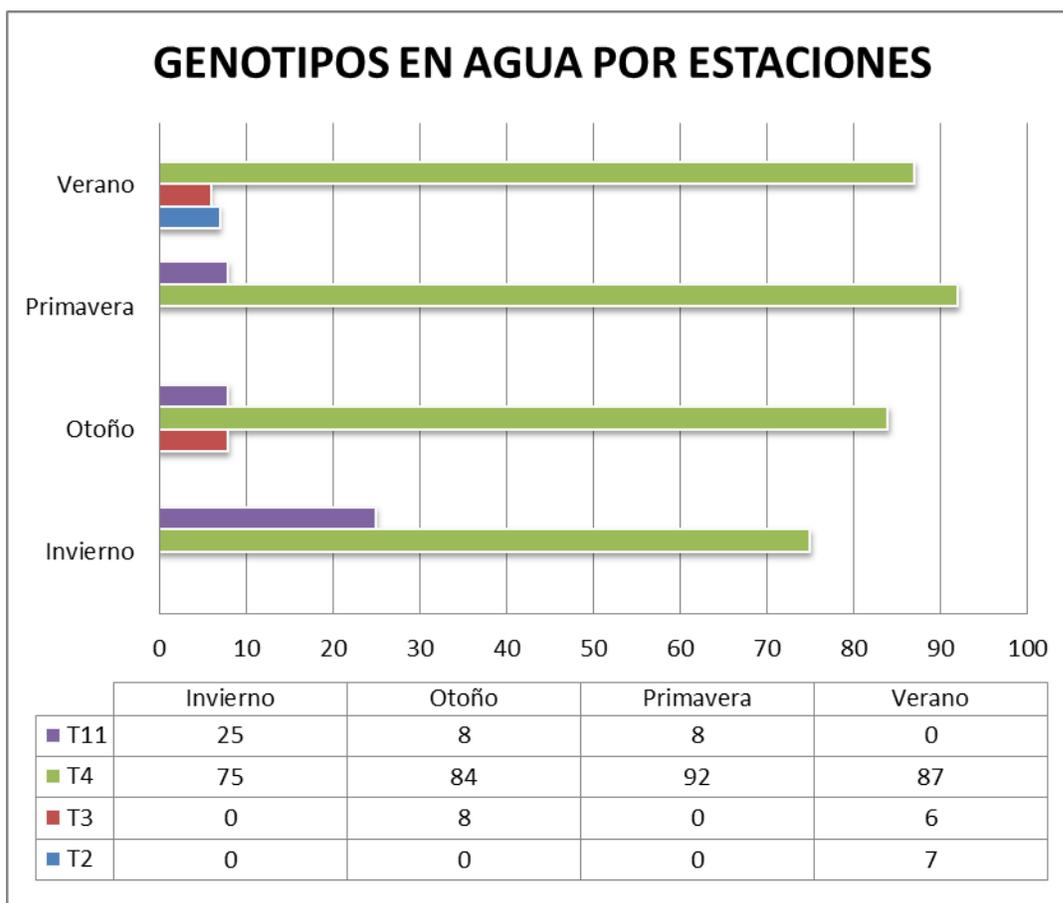
**Gráfico N°33**



En el gráfico N°34 se describen los genotipos por estaciones. En invierno, se identificaron 2 genotipos en las 8 muestras positivas, el genotipo T4 en un 75% (6/8) y el genotipo T11 en 25% (2/8). En otoño, se identificaron 3 genotipos en las 12 muestras positivas, el genotipo T3 con un 8% (1/12), el genotipo T4 con un 84% (10/12), el genotipo T11 con un 8% (1/12). En primavera, se identificaron 2 genotipos en las 12 muestras positivas, el genotipo T4 con un 92% (11/12) y el genotipo T11 con un 8% (1/12). En verano se identificaron 3 genotipos en las 31 muestras positivas, el genotipo T2 con un 7% (2/31), el genotipo T3 con un 6% (2/31), el genotipo T4 con un 87% (27/31).

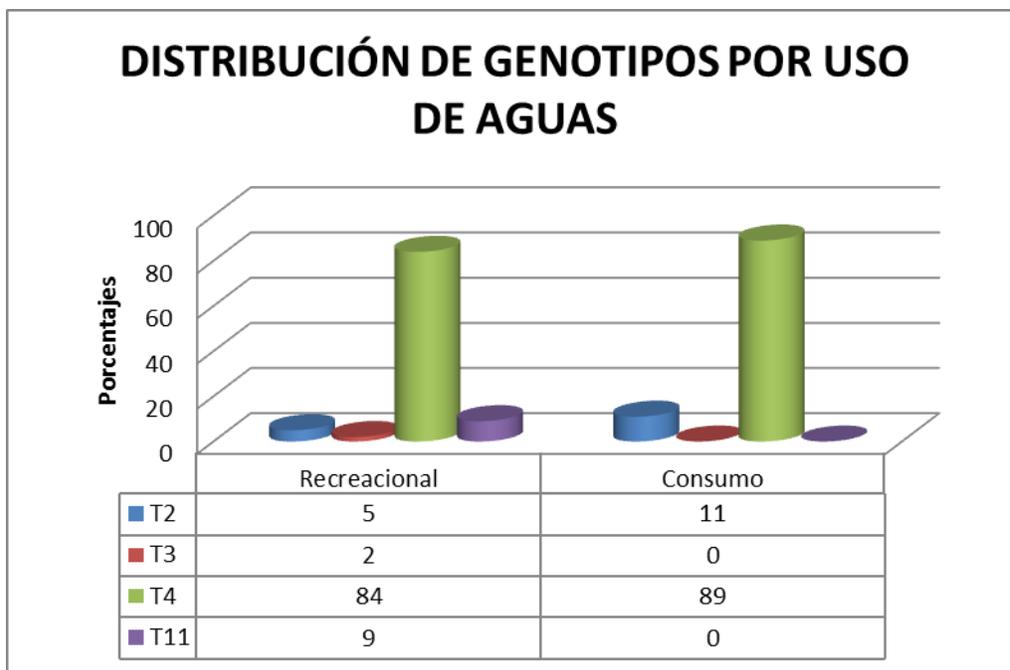
Análisis estadístico de asociaciones no se pudo realizar porque hay muchas frecuencias muy bajas (menores que 5) o iguales a cero, predominando el genotipo T4.

**Gráfico N°34**



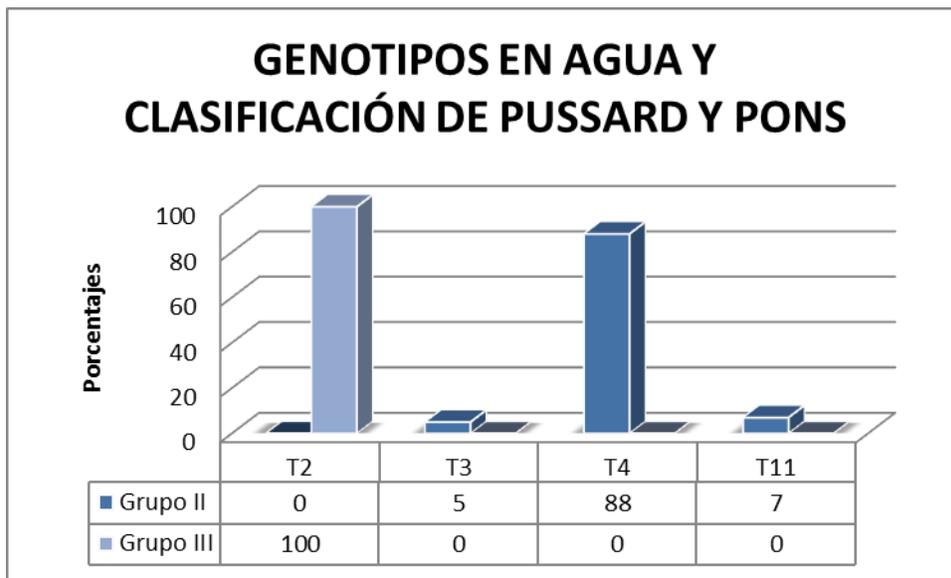
En el gráfico N°35 se muestra la distribución de genotipos por uso de aguas. En 45 muestras de aguas recreacionales se encontraron 4 genotipos, el genotipo T4 con un 84% (38/45), el genotipo T11 con un 9%, (4/45) el genotipo T2 con un 5% (2/45) y el genotipo T3 con un 2% (1/45). En las 18 muestras de aguas de consumo se identificaron 2 genotipos, el genotipo T4 con un 89% (16/18) y el genotipo T2 con un 11% (2/18).

**Gráfico N°35**



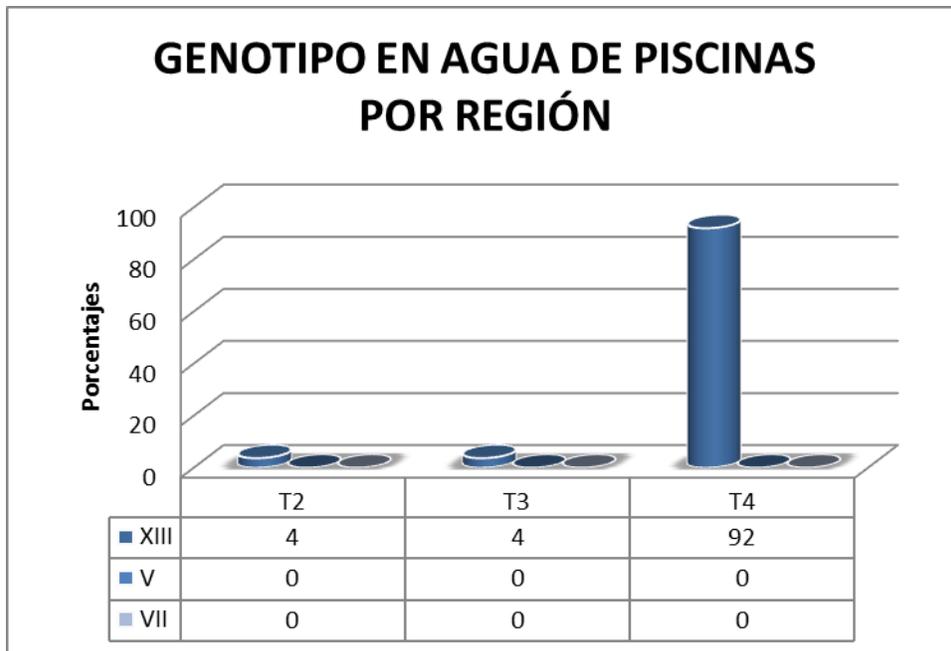
En el gráfico N°36, se observa los genotipos incluidos en los Grupos II y III de Pussard y Pons. En el Grupo II se incluyeron 61 *Acanthamoeba* spp., en ellas fueron identificados los genotipo T3, T4 y T11. El genotipo T3 con un 5% (3/61), el genotipo T4 con un 88% (54/61) y el genotipo T11 con un 7% (4/61). En el grupo III de Pussard se identificó un solo genotipo correspondiente al T2 con un 100% (2/2).

**Gráfico N°36**



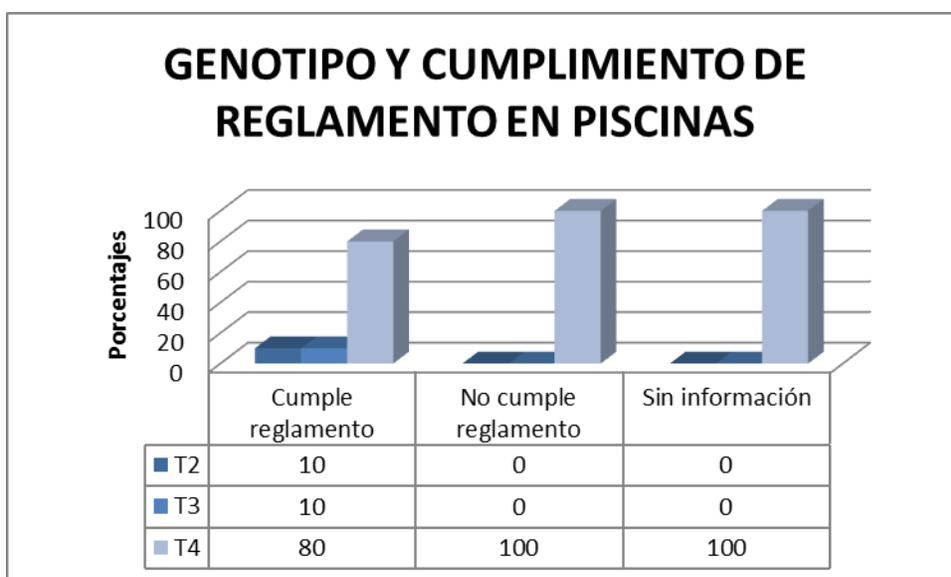
En el gráfico N°37 se observa la distribución de los genotipos en agua de piscinas, encontrándose positivos (27/82) sólo en la Región XIII, en un 92% (25/27) el genotipo T4, un 4% (1/27) el genotipo T2 y un 4% (1/27) el genotipo T3.

**Gráfico N°37**



En el gráfico N°38, se observa que en las 10 piscinas que cumplían el Reglamento de piscinas se identificaron los genotipos T2, T3 y T4. El genotipo T4 se encontró en un 80% (8/10), los genotipos T2 y T3 se identificaron en un 10% cada uno (1/10). En las piscinas que no cumplían el Reglamento, en el 100% (15/15) se encontró el genotipo T4. En las piscinas sin información al respecto, en el 100% (2/2) también se identificó el genotipo T4.

**Gráfico N°38**



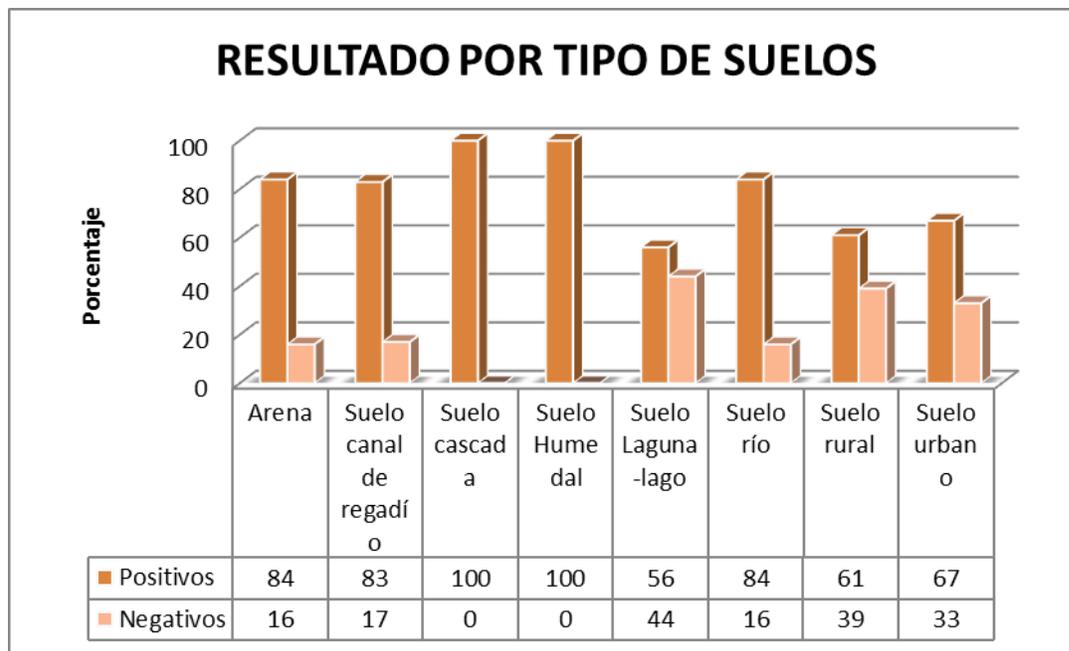
## C. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE SUELOS

### 1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE SUELOS

#### 1. 1 Resultados de acuerdo a tipo de muestras de suelos

En el gráfico N°39, se observa que en todos los tipos de muestras de suelo se aisló *Acanthamoeba* spp., los resultados de mayor a menor positividad son los siguientes: suelo de cascada 100% (3/3), suelo de humedal 100% (1/1), arena 84% (21/25), suelo de río 84% (21/25), suelo canal de regadío 83% (5/6), suelo urbano 67% (8/12), suelo rural 61% (11/18), suelo de laguna-lago 56% (5/9).

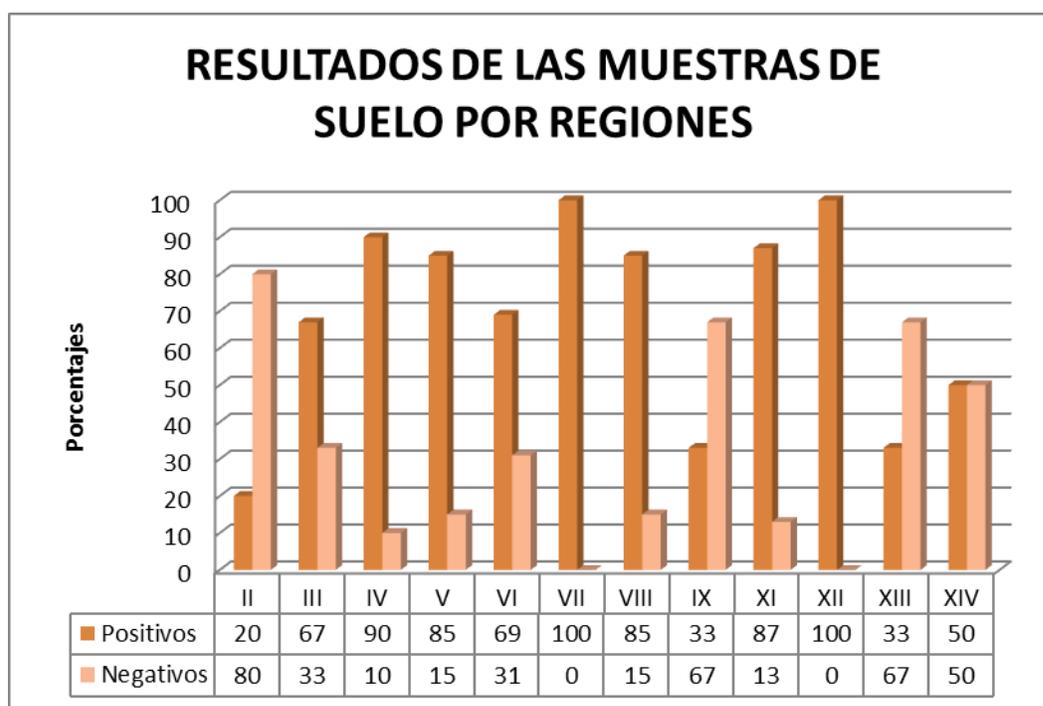
Gráfico N°39



## 1.2 Resultado de muestras de suelo por Regiones

En las muestras de suelo la distribución de los resultados por Regiones se presenta en el gráfico N°40, en este caso, no se tomaron muestras de suelo en las Regiones, I, X y XV. En todas las Regiones donde se tomó muestras se encontraron positivos. De mayor a menor los resultados fueron los siguientes: las Regiones VII y XII presentaron un 100% de positividad (13/13 y 1/1, respectivamente), en la IV Región se obtuvo un 90% (9/10), en la XI se obtuvo un 87% (7/8), en las Regiones V y VIII Regiones se obtuvo un 85% (17/20 y 11/3 respectivamente), en la Región VI un 69% (9/13), en la Región III un 67% (2/3), en la Región XIV un 50% (2/4), en las Regiones IX y XIII un 33% (1/3 y 2/6 respectivamente) y en la Región II un 20% (1/5).

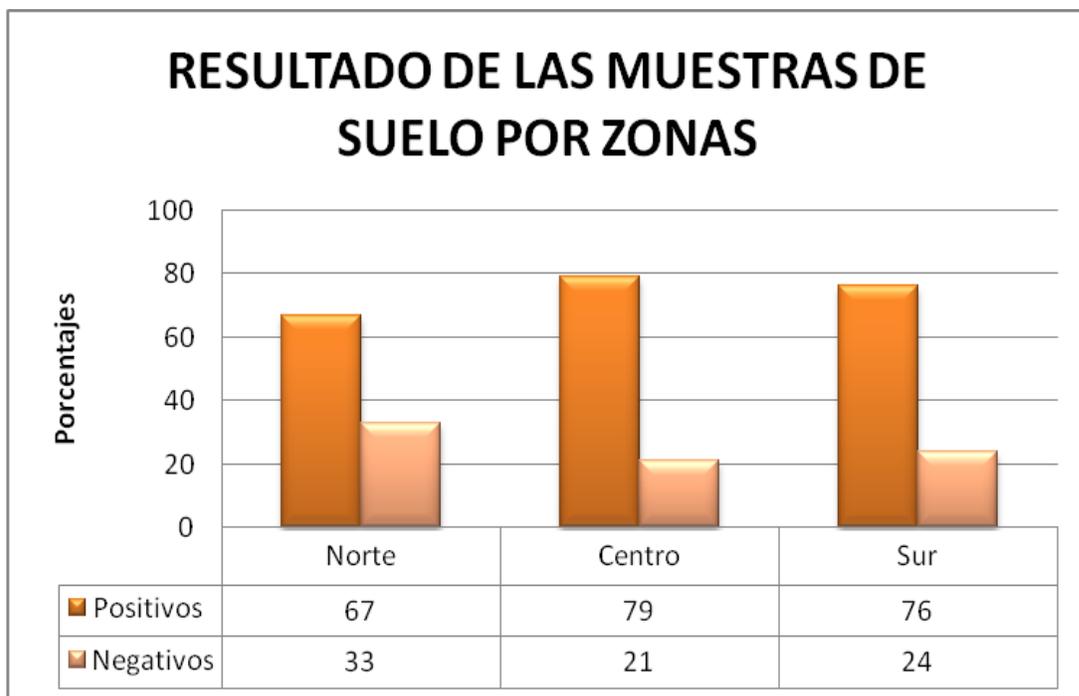
**Gráfico N°40**



En el gráfico N°41 se presentan los resultados de las muestras positivas de suelos por zonas, en la zona centro se identificó *Acanthamoeba* spp. en 79% (41/52), en la zona sur 76% (22/29) y en el norte 67% (12/18).

No se observaron diferencias estadísticas significativas en los porcentajes de positividad en las diferentes zonas ( $\chi^2= 1,08$ ; p-valor= 0,58).

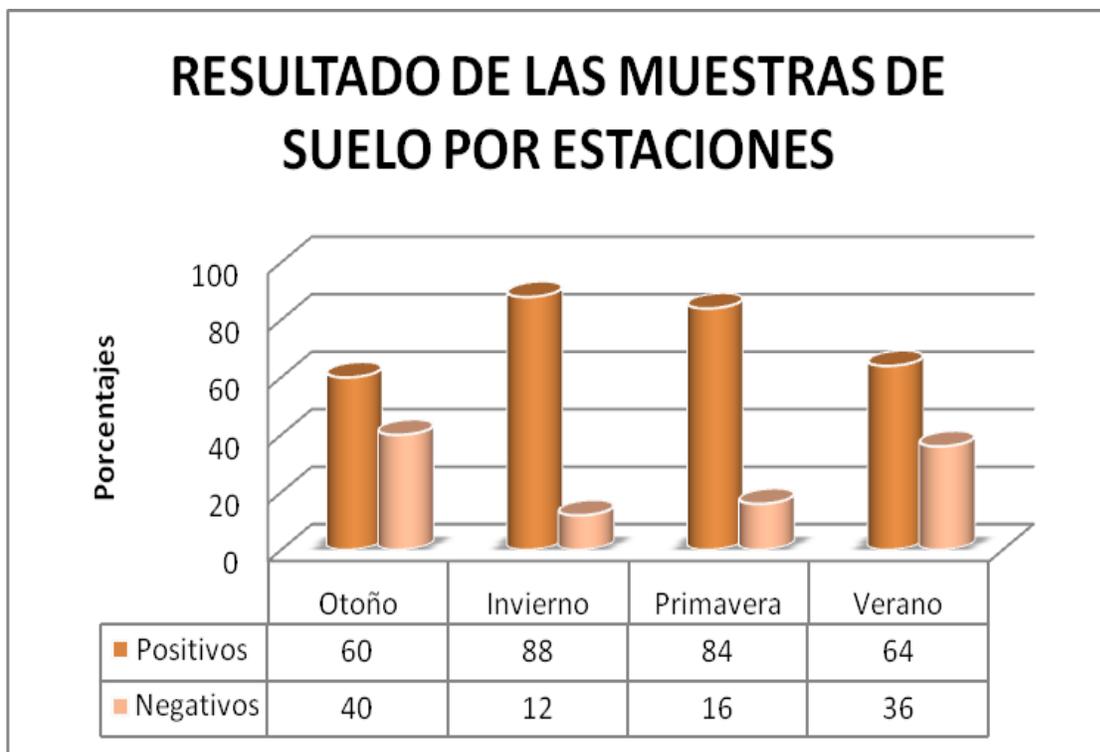
**Gráfico N°41**



En el gráfico N°42, se puede observar la distribución de los resultados de las muestras de suelos por estaciones. La mayor positividad estuvo en invierno con un 88% (23/26), seguido por la primavera con 84% (26/31), luego por el verano con 64% (14/22) y finalizando con el otoño con 60% (12/20).

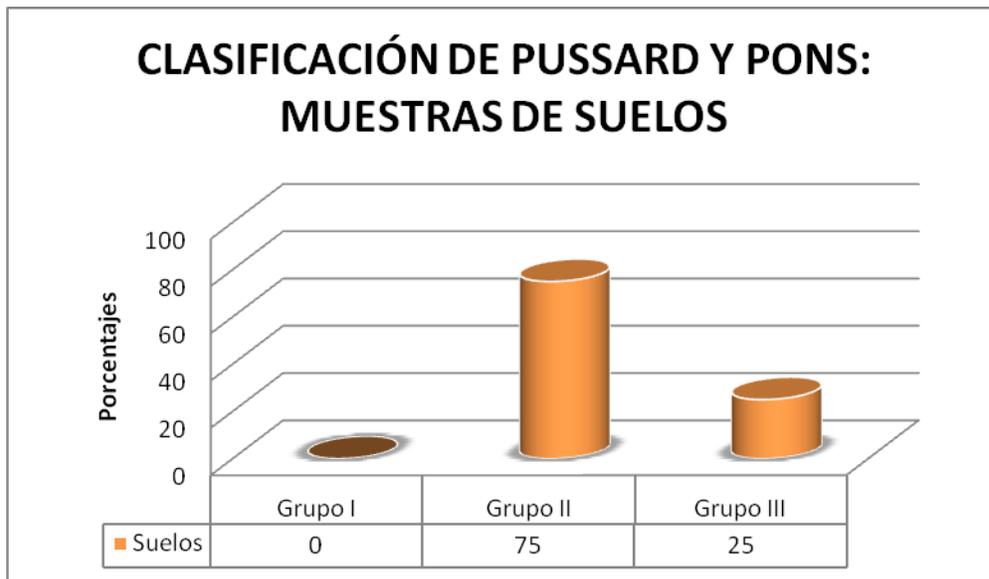
En el caso de las muestras de suelo, se observaron asociaciones significativas con las estaciones del año ( $\chi^2=7,8$ ; p-valor=0,005).

**GRÁFICO N°42**



En el gráfico N°43, en las 75 *Acanthamoeba* spp. clasificadas en los Grupos II y III de Pussard y Pons, de acuerdo al tamaño y morfología de los quistes se observó que la medición mínima fue de 10,59µm, la medición máxima de 24,13µm. En el grupo II quedaron incluidas el 75% (56/75) de *Acanthamoeba* spp. y 25% (19/75) al grupo III.

**Gráfico N°43**



## Termotolerancia a 42°C en muestras de suelos

Se presenta un ejemplo de crecimiento del cultivo en 4 muestras. En la foto N°83 se observa que el crecimiento del cultivo de la muestra 23S el que se completó a las 48 horas (crecimiento completo de la placa) y en la foto N°84, la muestra 26S muestra crecimiento hasta las 72 horas. En la foto N°85, la muestra 92S presenta crecimiento parcial (crecimiento menor al total de la placa) y en la foto N°86 la muestra 59S sólo tuvo crecimiento hasta las 24 hrs.

Foto N°83

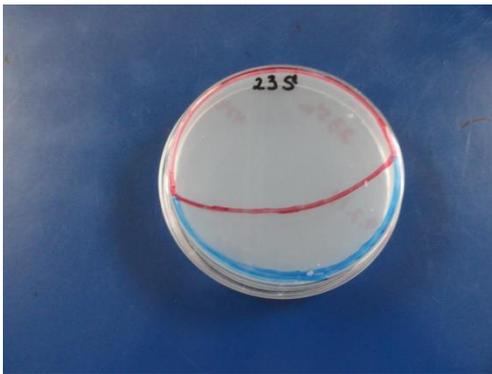


Foto N°84

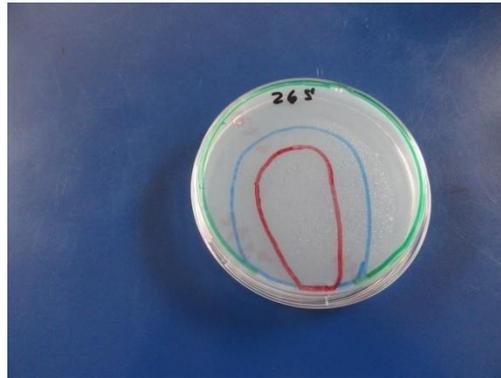


Foto N°85

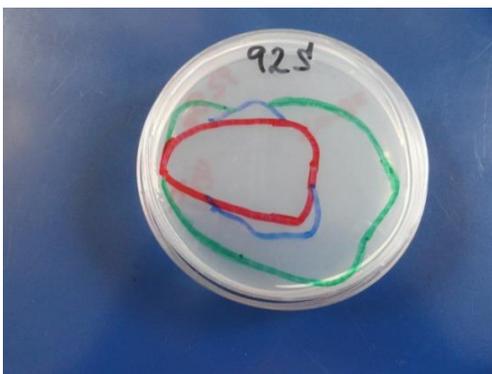
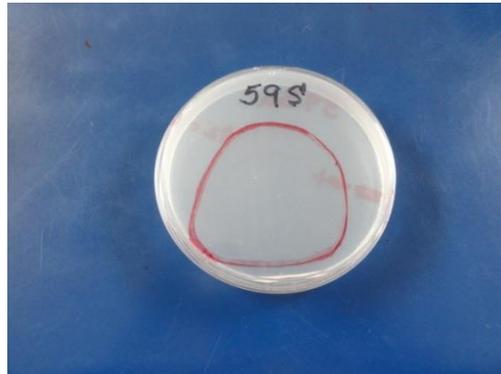


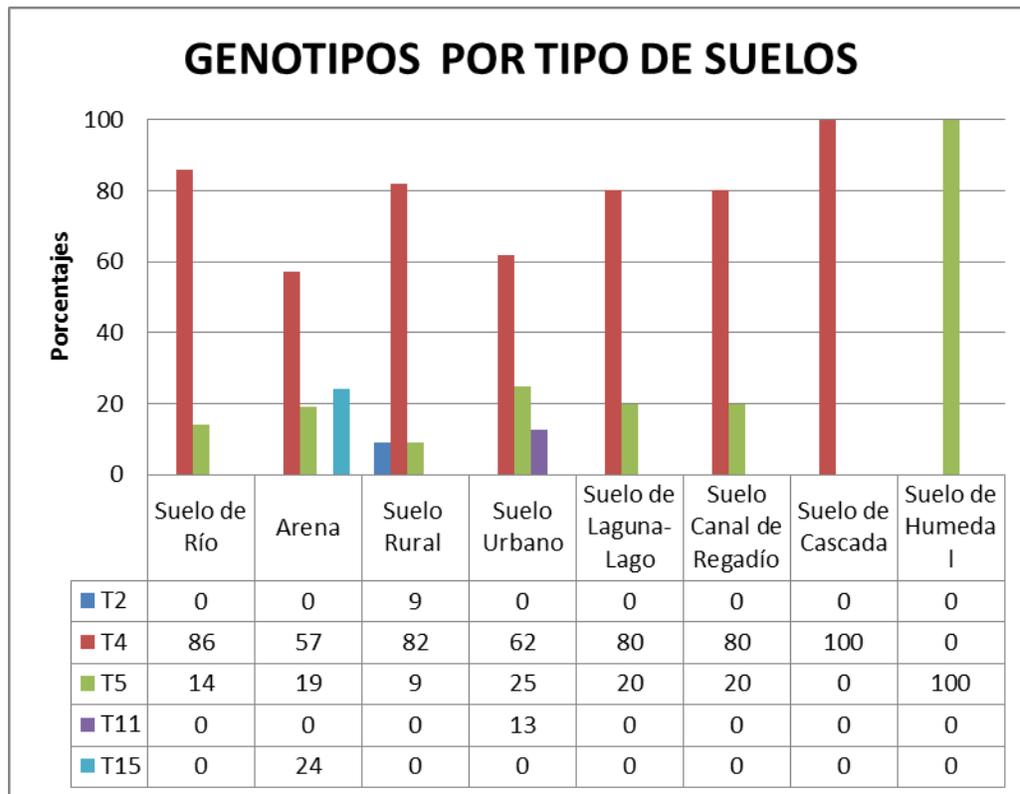
Foto N°86



## 2. RESULTADO DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE SUELOS

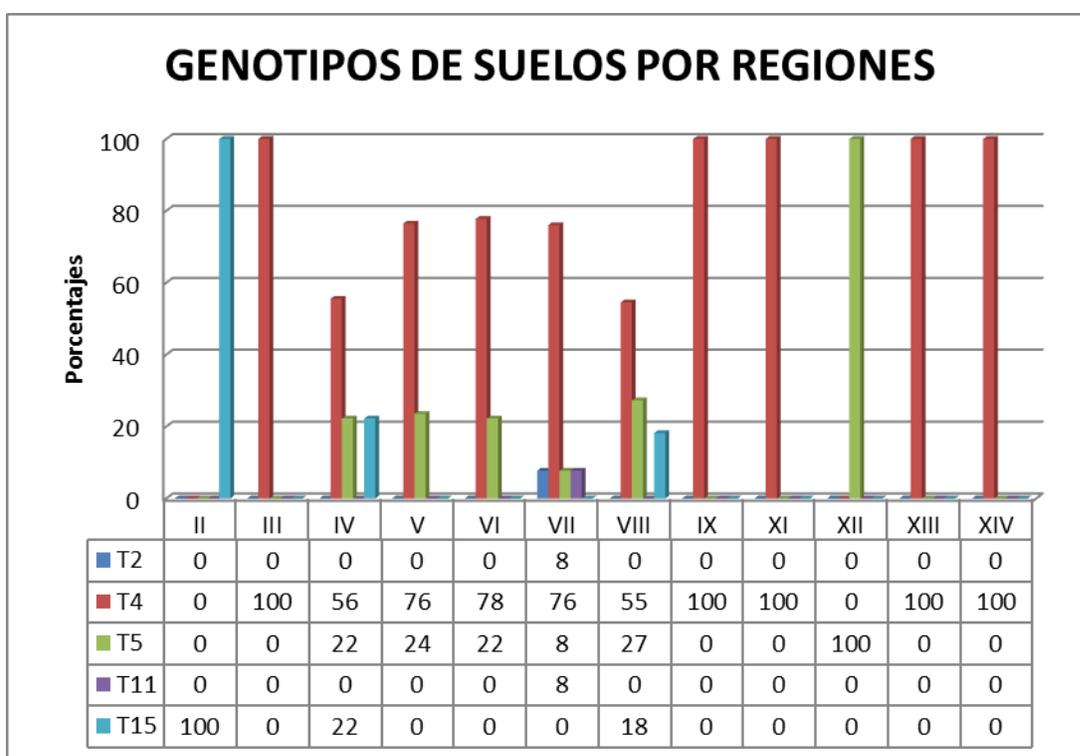
El gráfico N°44 muestra el predominio del genotipo T4 entre 57 a 100%, el mayor porcentaje se encontró en suelo de río con un 86% (18/21). El genotipo T5 se identificó entre el 9 al 100%, este último porcentaje se obtuvo en muestra de suelo de humedal. El genotipo T2 sólo se encontró en suelo rural con un 9% (1/11). El genotipo T11 sólo se encontró en suelo urbano con un 13% (1/8). El genotipo T15 sólo se encontró en arena con un 24% (5/21).

Gráfico N°44



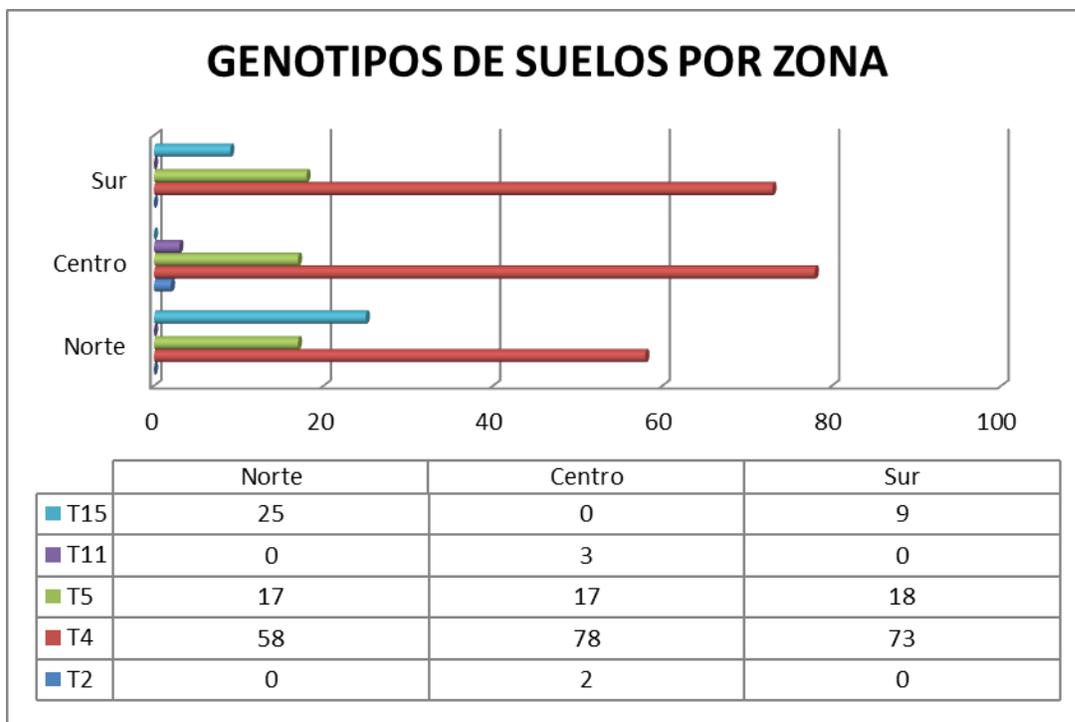
En el gráfico N°45 se observa la distribución de los suelos en las 12 Regiones donde se tomó muestras. El genotipo T4 se encontró en 10 Regiones con positividad entre 55 a 100%. El genotipo T5 se identificó en 6 Regiones entre 8 a 100%. El genotipo T15 se encontró en 3 Regiones con porcentajes de 100, 22 y 18%. El genotipo T2 sólo se encontró en la VII Región con un 8% (1/13). El genotipo T11 también sólo se encontró en la VII Región con un 8%.

**Gráfico N°45**



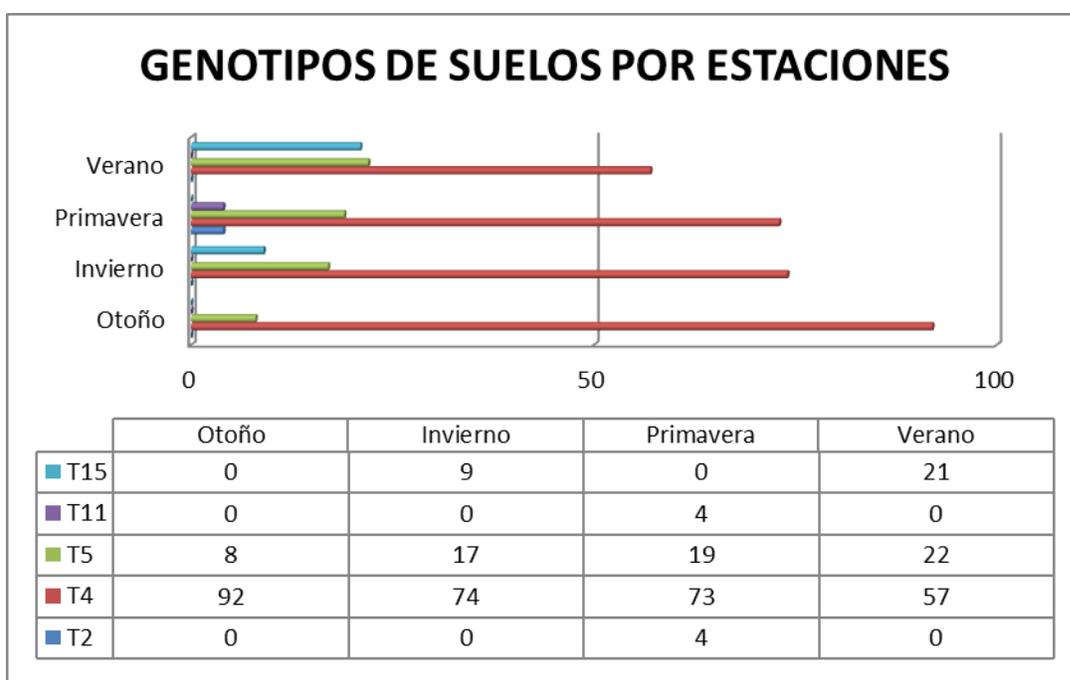
En el gráfico N°46, se presenta la distribución de los genotipos por zona. Los genotipos T4 y T5 se encontraron en las 3 zonas. El genotipo T4 con un 58% (7/12) en el norte, 78% (32/41) en el centro y 73% (16/22) en el sur. El genotipo T5 con un 17% (2/12) en el norte, 17% (7/41) en el centro y 18% (4/22) en el sur. El genotipo T15 con un 25% (3/12) en el norte y un 9% (2/22) en el sur. El genotipo T2 con un 2% (1/42) en el centro.

**Gráfico N°46**



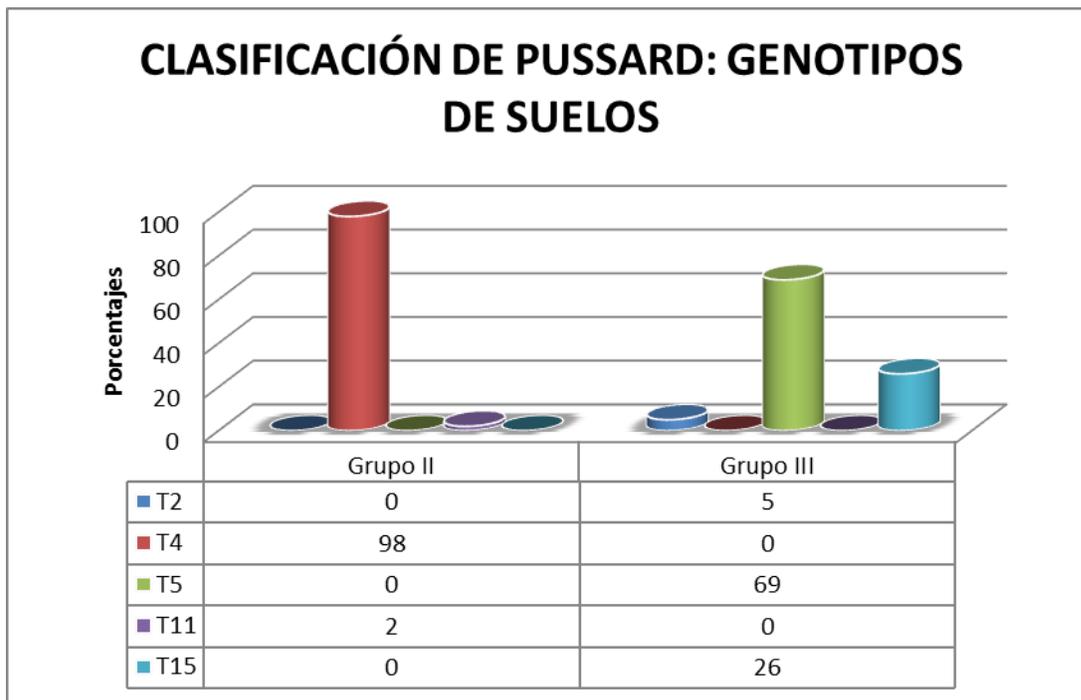
En el gráfico N°47 se observa que en todas las estaciones se identificaron los genotipos T4 y T5. El genotipo T4 en otoño con 92% (11/12), en invierno con 74% (17/23), en primavera con 73% (19/26) y en verano con 57% (8/14). El genotipo T5 con un 8% (1/12) en otoño, 17% (4/23) en invierno, 19% (5/26) en primavera y 22% (3/14) en verano. El genotipo T15 con 21% (3/14) en verano y 9% (2/23) en invierno. Los genotipos T2 y T11 con 4% cada uno (1/26) se encontraron sólo en primavera.

**Gráfico N°47**



El gráfico N°48 muestra la distribución de los genotipos en los Grupos II y III de Pussard y Pons. En el Grupo II el genotipo T4 en un 98% (55/56) y el genotipo T11 en un 2% (1/56). En el Grupo III se identificaron 3 genotipos, el genotipo T5 se encontró en un 69% (13/19), El genotipo T15 se encontró en un 26% (5/19). El genotipo T2 se encontró en un 5% (1/19).

**Gráfico N°48**



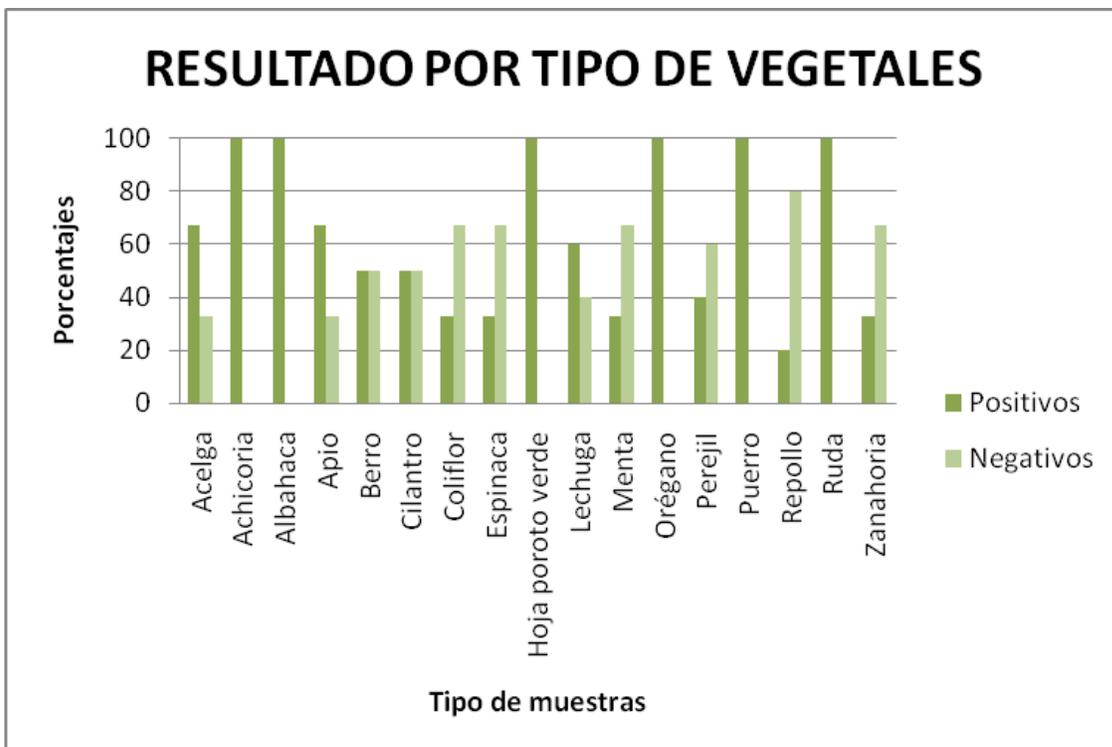
## D. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE VEGETALES

### 1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE VEGETALES

#### 1. 1 Resultados de acuerdo a tipo de muestras de vegetales

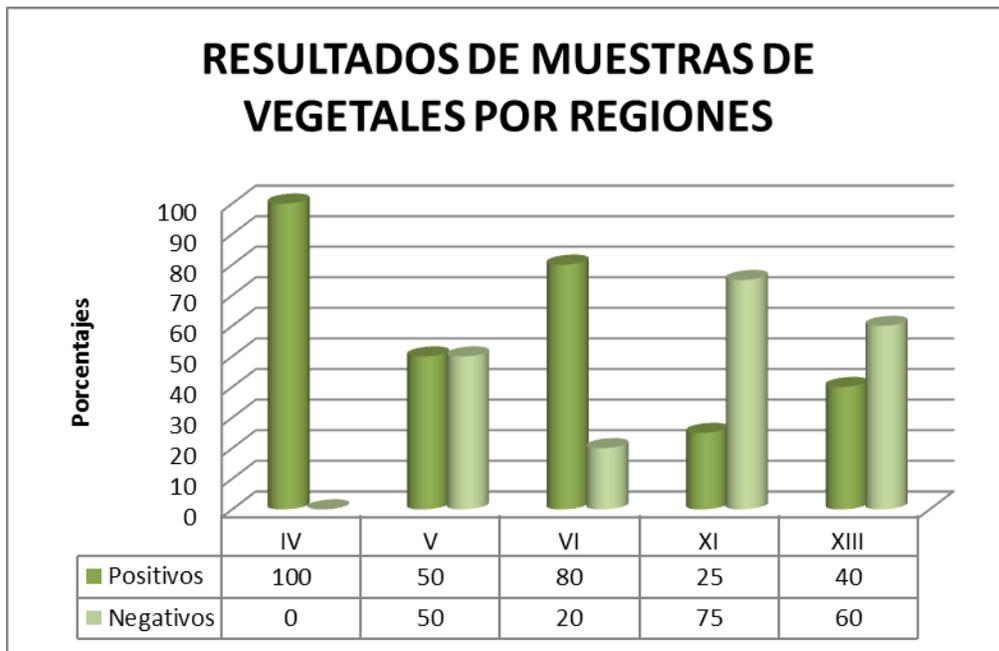
En el gráfico N°49 se presenta los tipos de muestras de vegetales que dieron positivos y que fueron los siguientes: achicoria 100% (2/2), orégano 100% (2/2), puerro 100% (1/1), albahaca 100% (1/1), ruda 100% (1/1) y hoja poroto verde con un 100% (1/1), acelga 67% (4/6), apio 67% (2/3), lechuga 60% (6/10), cilantro 50% (3/6), berro 50% (1/2), perejil 40% (2/5), zanahoria 33% (2/6), espinaca 33% (1-), coliflor 33% (1/3), menta 33% (1/3), repollo 20% (1/5). Los vegetales negativos fueron los siguientes: Betarraga (3/3) ciboulette (1/1), haba (1/1), mentacoca (1/1), paico (1/1), rabanito (1/1), hierbabuena (1/1), teína (1/1) y piña (1/1).

Gráfico N°49



En el gráfico N°50 se puede observar que se tomaron muestras de vegetales en 5 Regiones, IV, V, VI, XI y XIII. En la IV Región se encontró un 100% (2/2) de positividad. En la VI Región un 80% (4/5). En la V Región con un 50% (4/8). En la XIII Región un 40% (21/52) y en la Región XI con 25% (1/4).

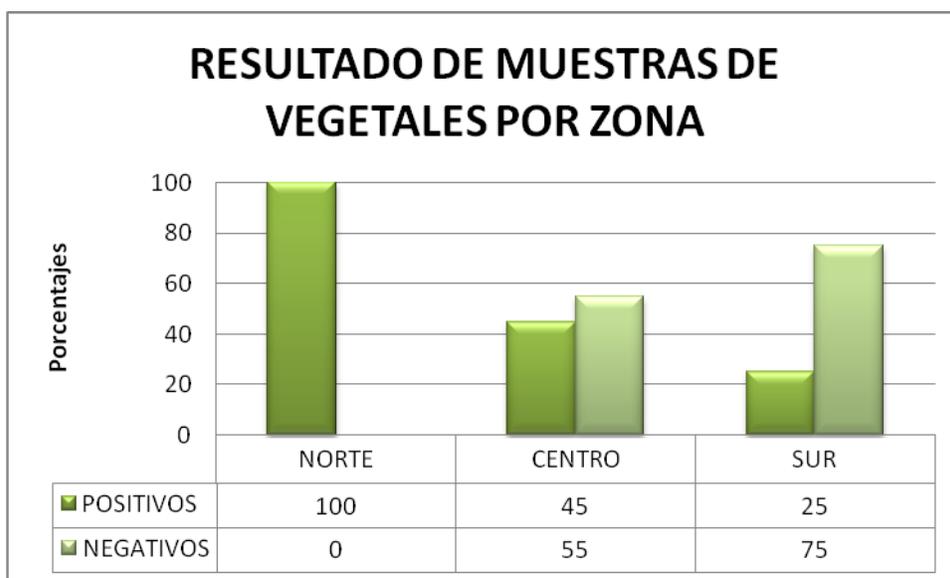
**Gráfico N°50**



En el gráfico N°51 se observa los resultados de las muestras positivas de vegetales por zonas. En la zona norte con un 100% (2/2), en la zona centro un 45% (29/65) y en la zona sur un 25% (1/4).

No se pudo realizar una comparación estadística entre zonas por el número de muestras muy diferentes en cada una de ellas.

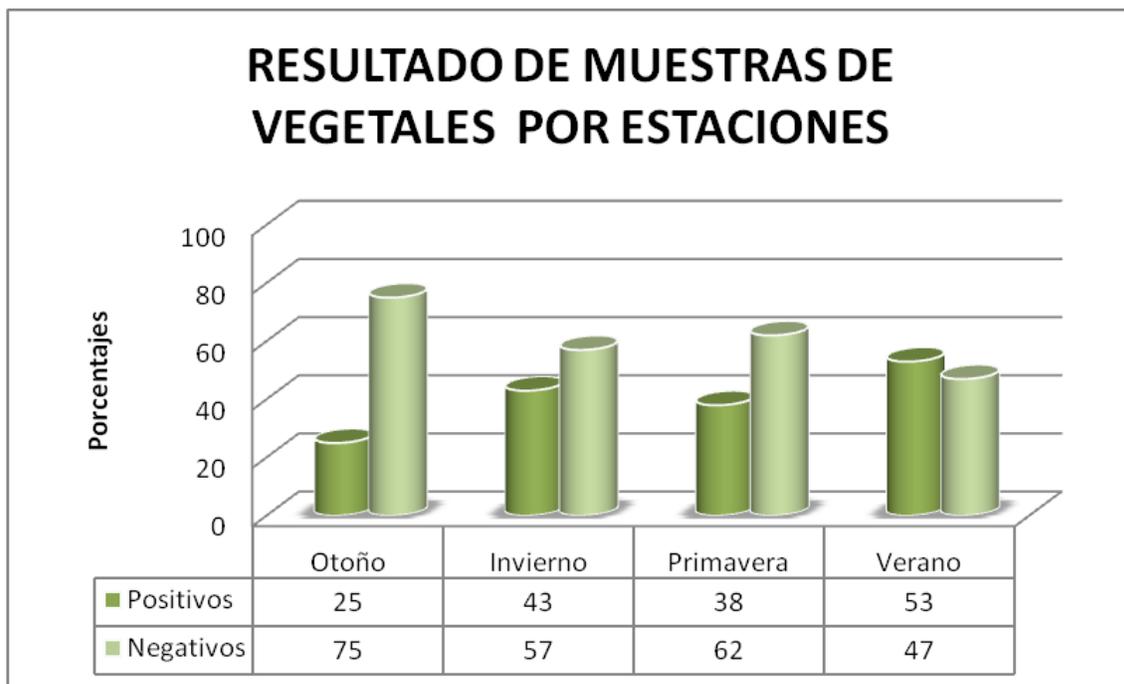
**Gráfico N°51**



En el gráfico N°52 se observa las muestras de vegetales por estaciones, en el verano se aislaron *Acanthamoeba* spp. en 53% (16/30), seguido por 43% (9/21) en invierno, 38% (6/16) en primavera y 25% (1/4) en otoño.

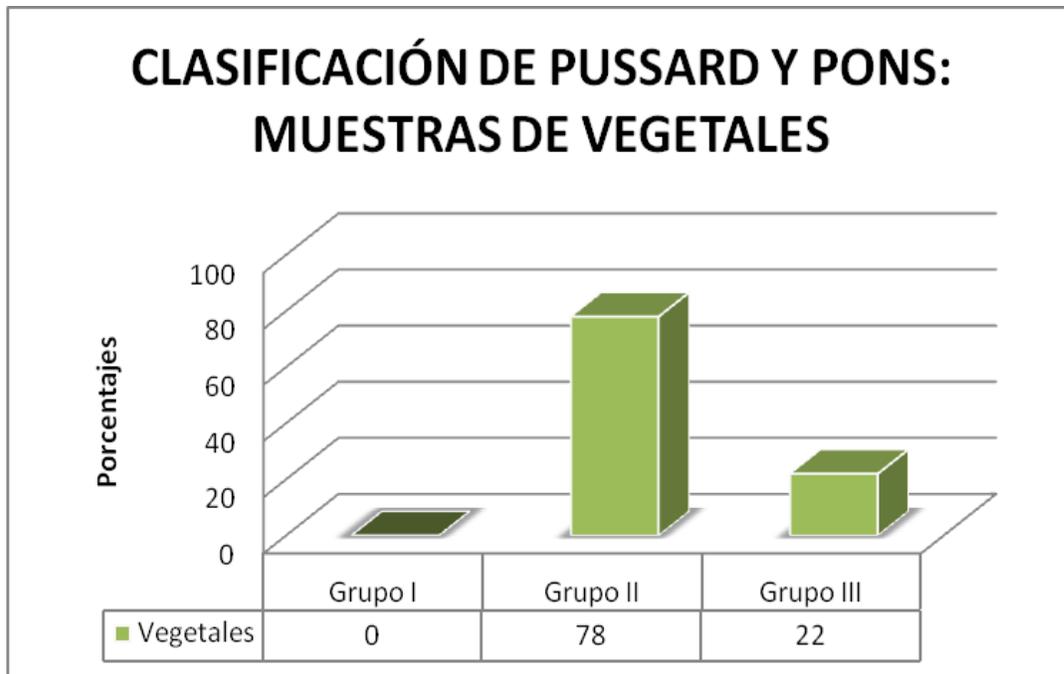
En este caso, las asociaciones entre estación del año y positividad no resultaron significativas ( $\chi^2=1,89$ ; p-valor=0,59), pero debe tenerse en cuenta que el test estadístico podría no ser válido ya que durante el otoño las muestras son menores a 5.

**Gráficos N°52**



En el gráfico N°53, se observa que en las muestras de vegetales la medición mínima fue de 9,87µm, la medición máxima de 24,54µm. En el grupo II se incluyeron 78% (25/32) y 22% (7/32) al grupo III.

**Gráfico N°53**



## Termotolerancia a 42°C en muestras de vegetales

En las fotos N°87, 88, 89, 90 que corresponden a las muestras 9V, 58V, 16V y 51V, se observan situaciones similares a las descritas anteriormente.

Foto N°87

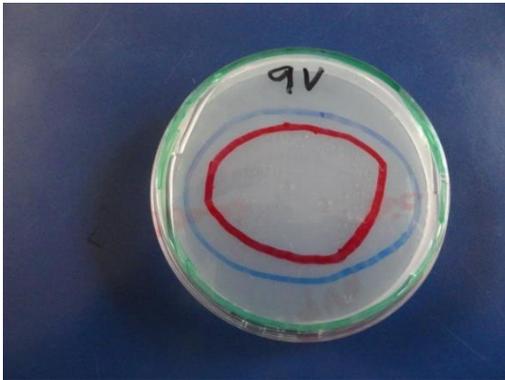


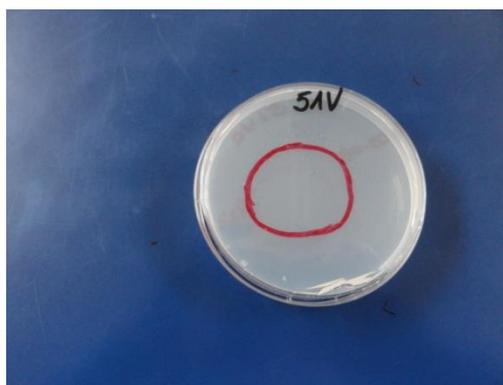
Foto N°88



Foto N°898



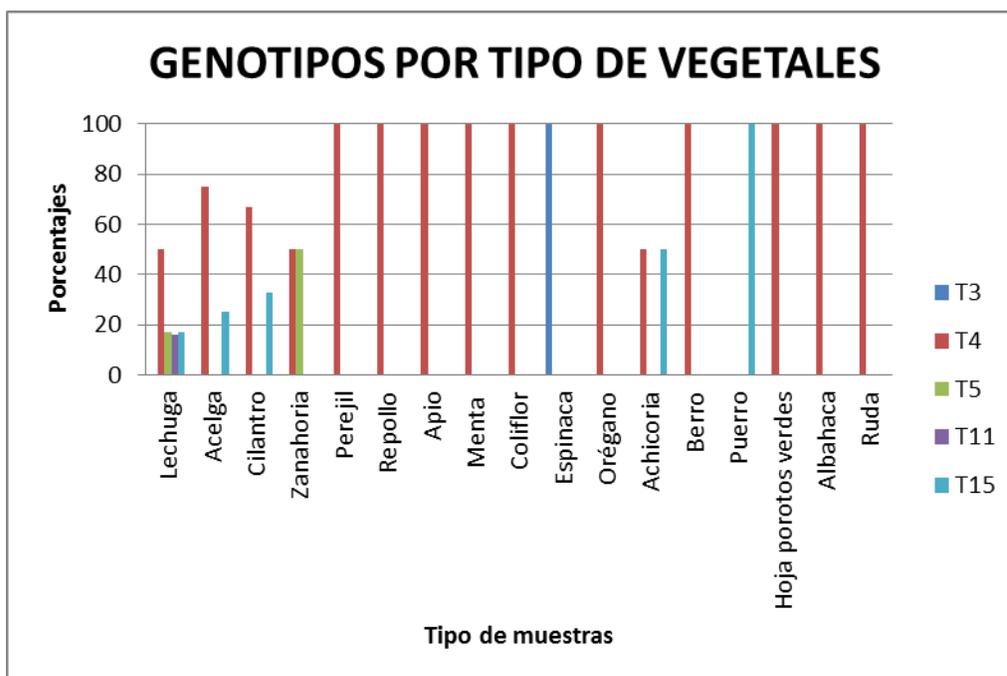
Foto N°90



## 2. RESULTADO DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE VEGETALES

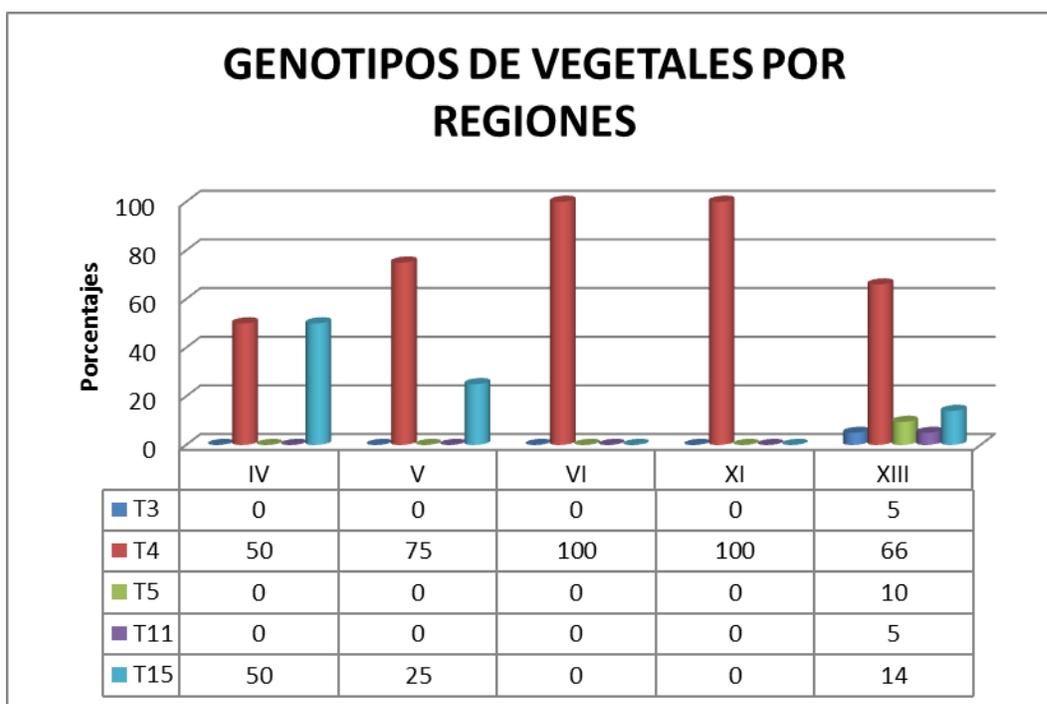
En el gráfico N°54 se observa que al igual que en las otras muestras, el predominio también lo obtiene el genotipo T4, el que se encontró en 15 tipos de vegetales, entre el 50 al 100%. El genotipo T15 se encontró en 5 tipos de vegetales entre un 17 a 100%. El genotipo T5 se identificó en 2 tipos de vegetales, 17 y 50%. El genotipo T3 y T11 sólo en 1 vegetal cada uno.

Gráfico N°54



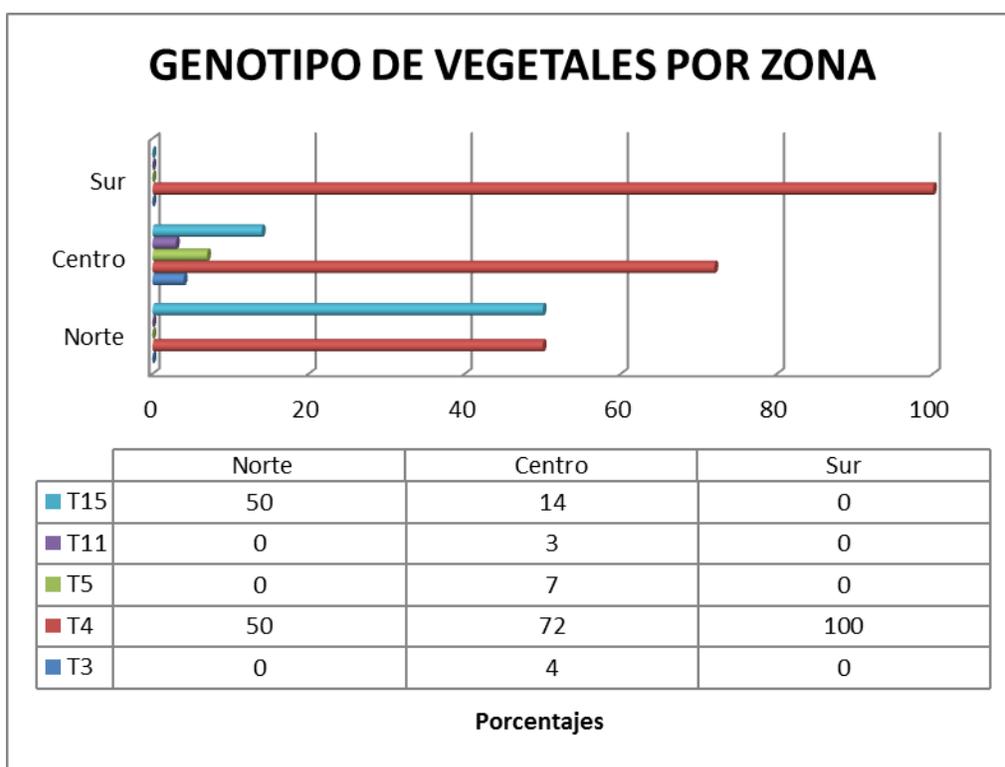
En el gráfico N°55, se observa que el genotipo T4 se encuentra en todas las Regiones entre el 50 al 100% de positividad. El genotipo T15 en 3 Regiones entre 14 a 50%. Los genotipos T3, T5 y T11 se aislaron sólo en la XIII Región, en la cual se identificaron los 5 genotipos identificados en este tipo de muestras.

**Gráfico N°55**



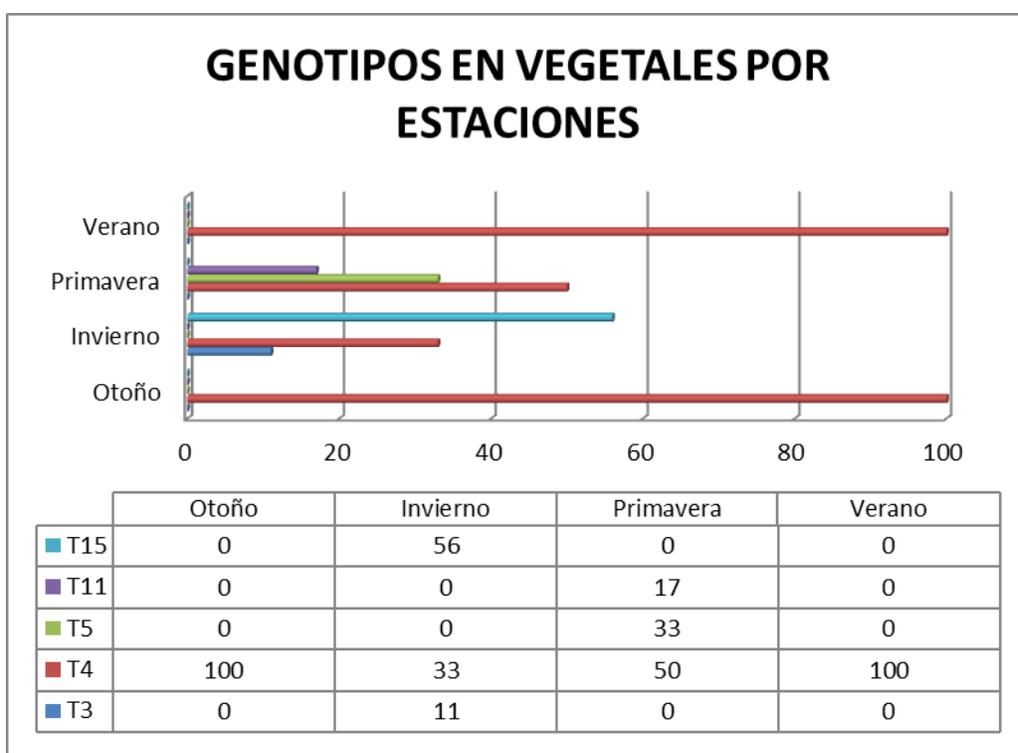
El gráfico N°56 muestra la distribución de los genotipos por zona. En la zona centro se identificaron todos los genotipos, lo que está representado por la XIII Región tal como se explicó en el gráfico anterior. El genotipo T4 se identificó en las 3 zonas entre el 50 al 100% de las muestras. El genotipo T15 fue aislado en la zona norte con un 50% (1/2) y en la zona centro con un 14% (4/29). Los genotipos T3 con un 4% (1/29), T5 con un 7% (2/29) y T11 con un 3% (1/29), sólo se encontraron en la zona centro.

**Gráfico N°56**



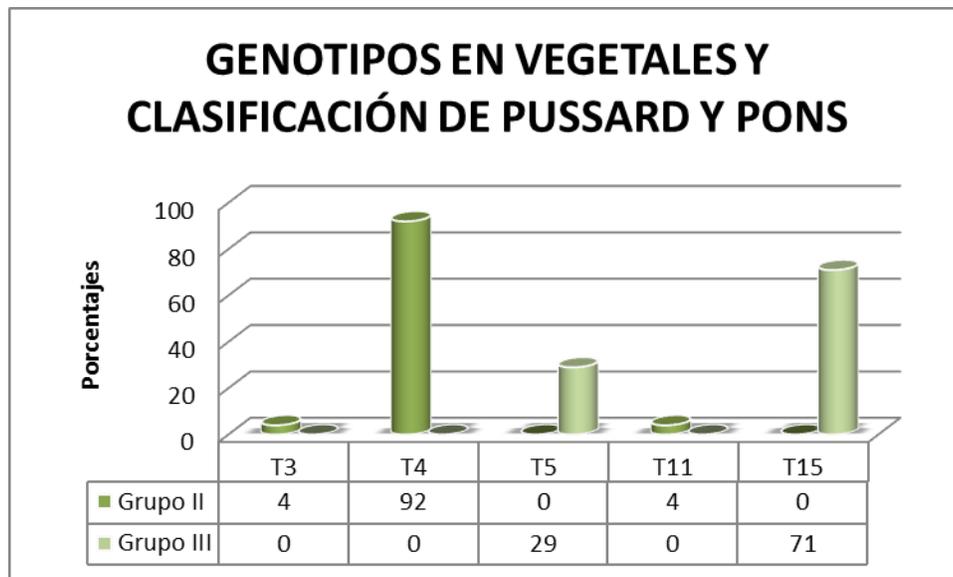
En el gráfico N°57, se observa que el único genotipo que se encuentra en las cuatro estaciones es el genotipo T4. En otoño y verano se identificaron sólo genotipo T4 en un 100% (1 y 16 muestras respectivamente). En primavera se identificaron 3 genotipos, T4 en un 50% (3/6), T5 en un 33% (2/6) y T11 en un 17% (1/6). En invierno se encontraron 3 genotipos, T3 en un 11% (1/9), T4 en un 33% (3/9) y T15 en un 56% (5/9).

**Gráfico N°57**



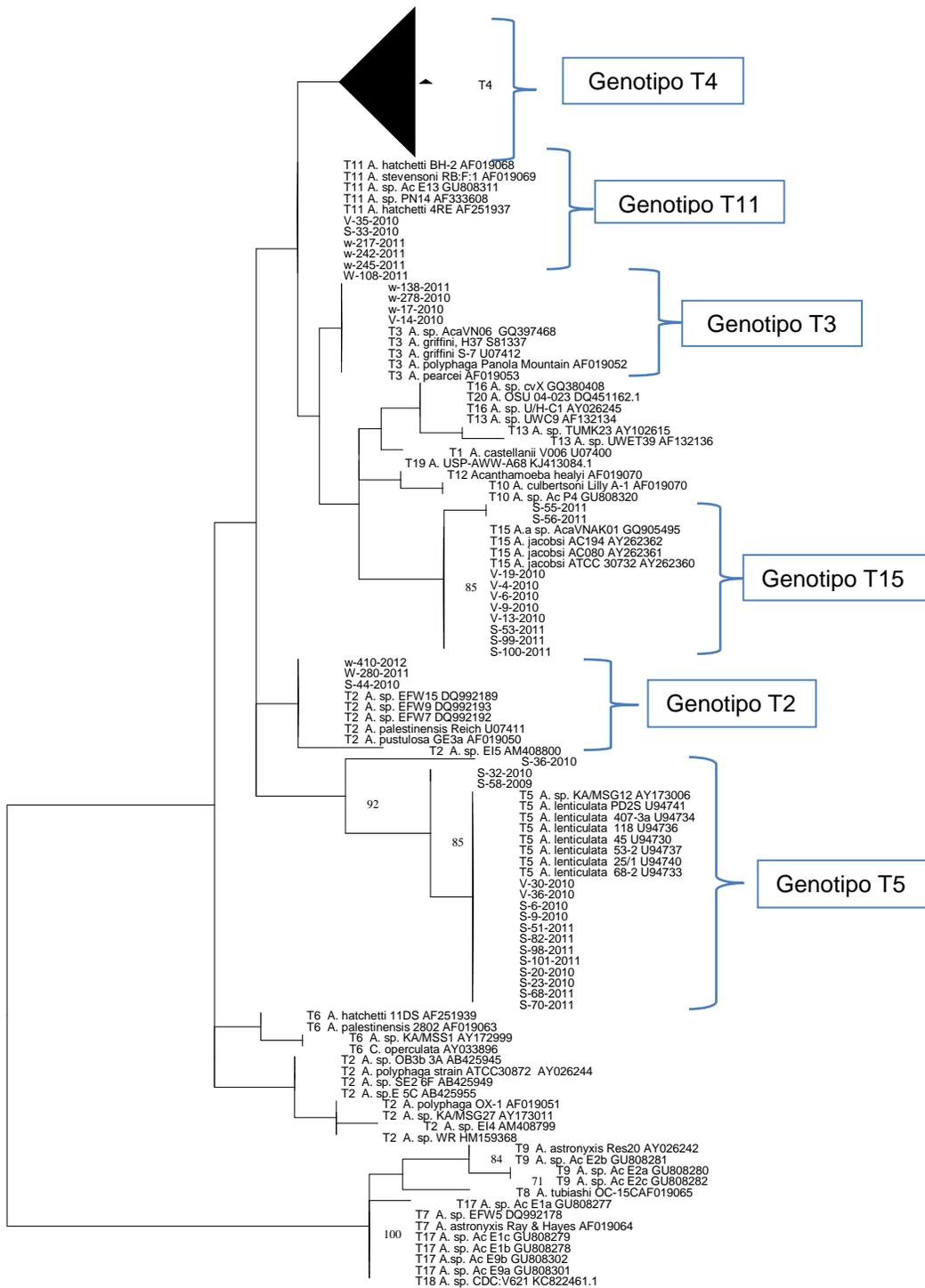
En el gráfico N°58, se observa que en las muestras de vegetales, en el grupo II de Pussard fueron identificados el genotipo T3 con un 4% (1/25), el genotipo T4 con un 92% (23/25) y el genotipo T11 con un 4% (1/9). En el grupo III de Pussard se identificó el genotipo T5 con un 29% (2/7) y el genotipo T15 con un 71% (5/7).

**Gráfico N°58**



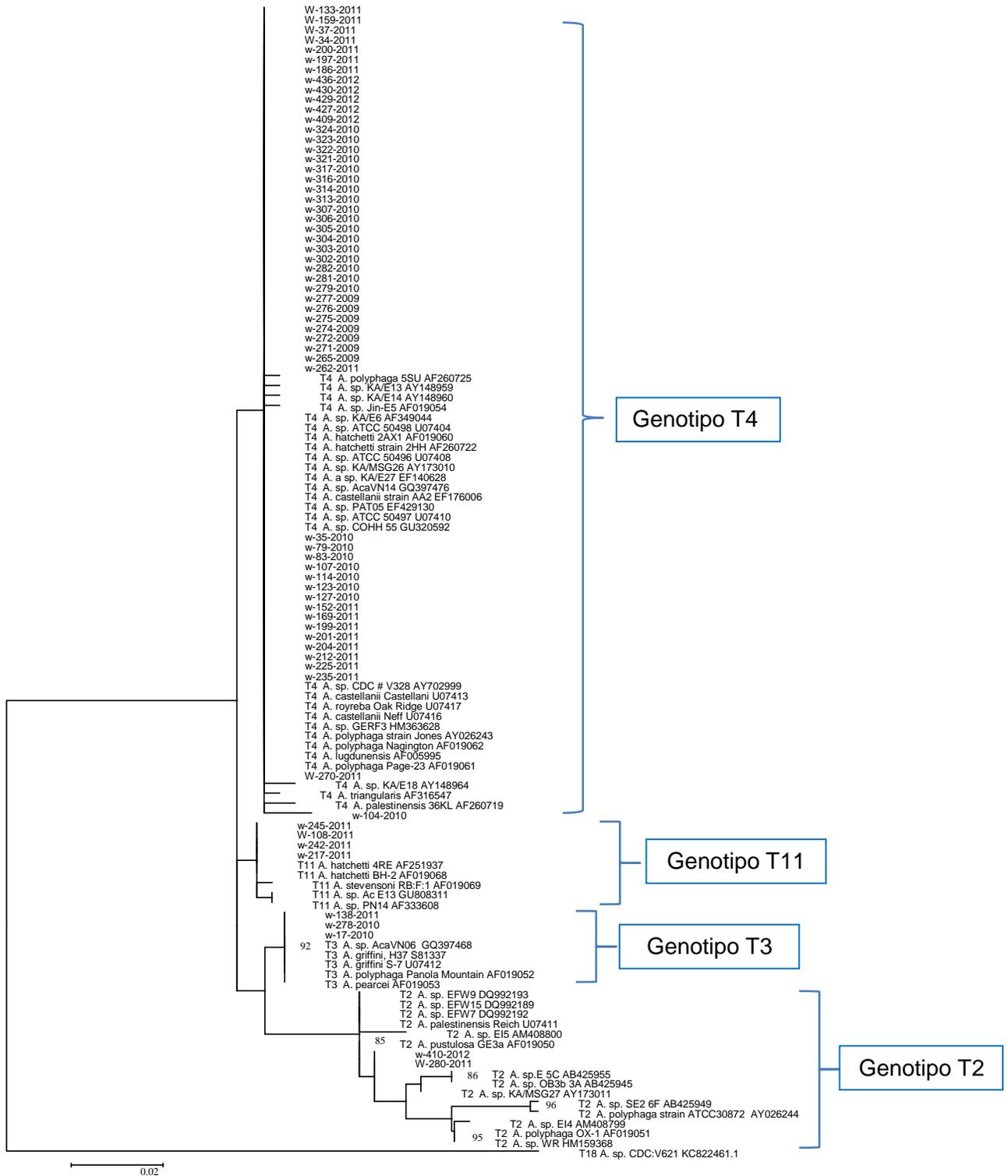
## E. RESULTADOS DE ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE *Acanthamoeba* spp.

**Figura10.** Genotipificación de muestras de *Acanthamoeba* aisladas de Aguas, Suelos y vegetales.



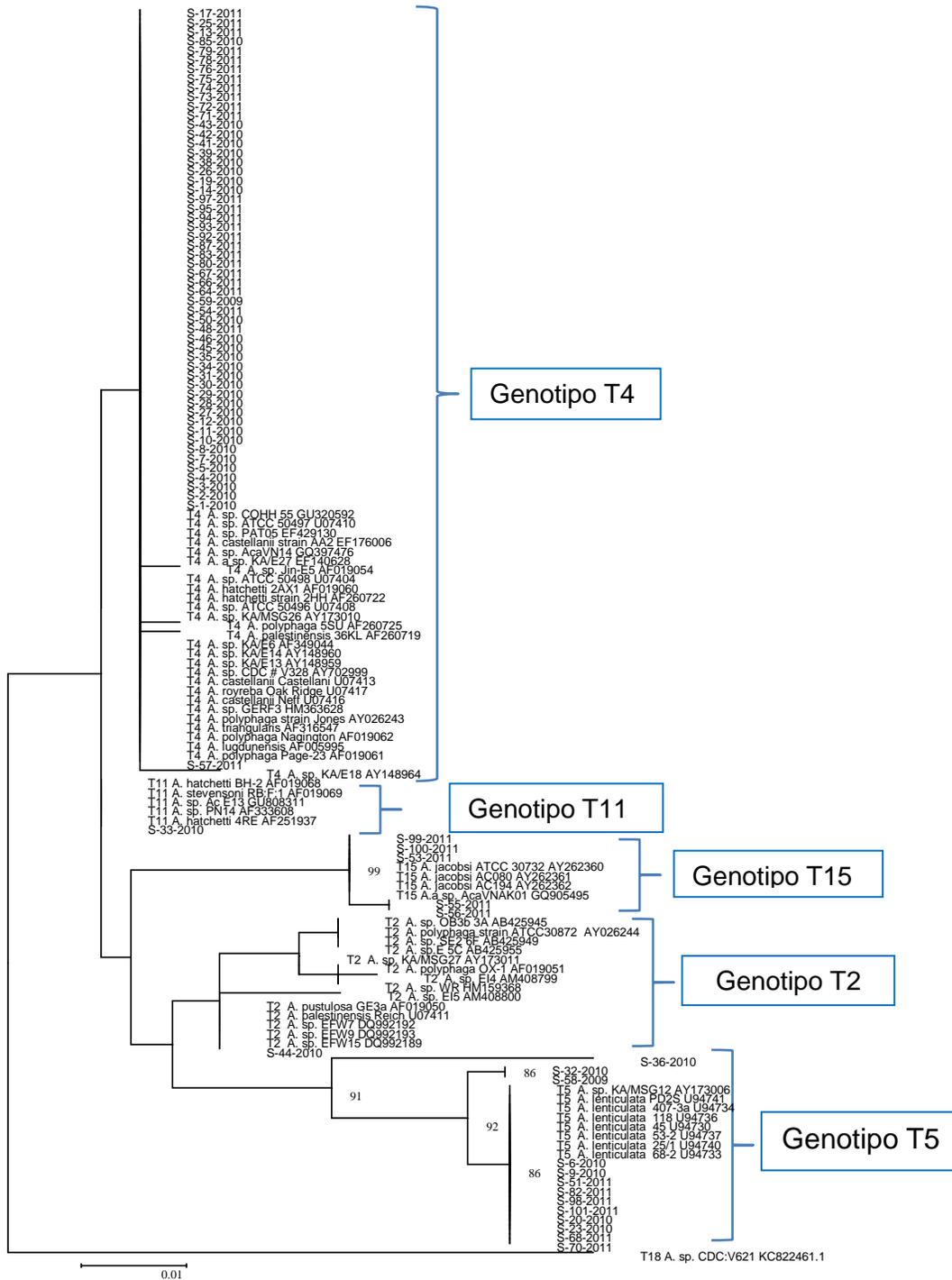
**Fig 9.** Árbol filogenético generado con software bioinformático Mega v6.06 con método estadístico Máxima Verosimilitud, test de filogenia 1000 bootstrap y modelo de sustitución Tamura 3-parameter model. El genotipo T4 fue representado de forma resumida por un triángulo debido al gran número de aislados (132). La secuencia analizada corresponde a un fragmento de 523 pb del amplicón ASA.S1

**Figura 11.** Genotipificación de muestras de *Acanthamoeba* aisladas de Agua



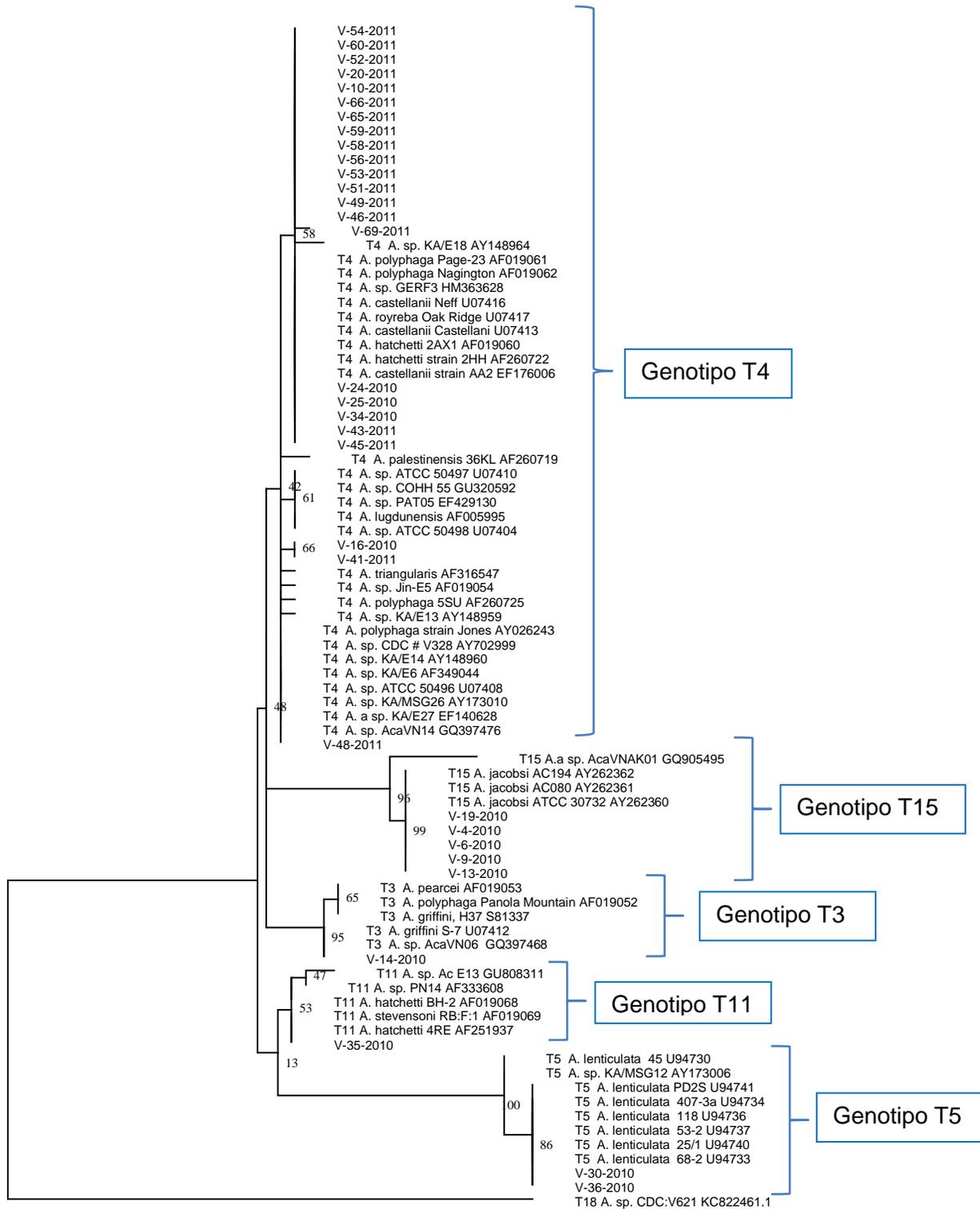
**Fig 10.** Árbol filogenético generado con software bioinformático Mega v6.06 con método estadístico Máxima Verosimilitud, test de filogenia 1000 bootstrap y modelo de sustitución Tamura 3-parameter model. La secuencia analizada corresponde a un fragmento de 523 pb del amplicón ASA.S1

**Figura 12.** Genotipificación de *Acanthamoeba* aisladas de Suelo



**Fig 11** Árbol filogenético generado con software bioinformático Mega v6.06 con método estadístico Máxima Verosimilitud, test de filogenia 1000 bootstrap y modelo de sustitución Tamura 3-parameter model. La secuencia analizada corresponde a un fragmento de 523 pb del amplicon ASA.S1

**Figura 13.** Genotipificación de *Acanthamoeba* aisladas de Vegetales.



**Fig 12.** Árbol filogenético generado con software bioinformático Mega v6.06 con método estadístico Máxima Verosimilitud, test de filogenia 1000 bootstrap y modelo de sustitución Tamura 3-parameter model. La secuencia analizada corresponde a un fragmento de 523 pb del amplicón ASA.S1

**Análisis de zona variante DF3 para la determinación de variantes en los genotipos identificados.**

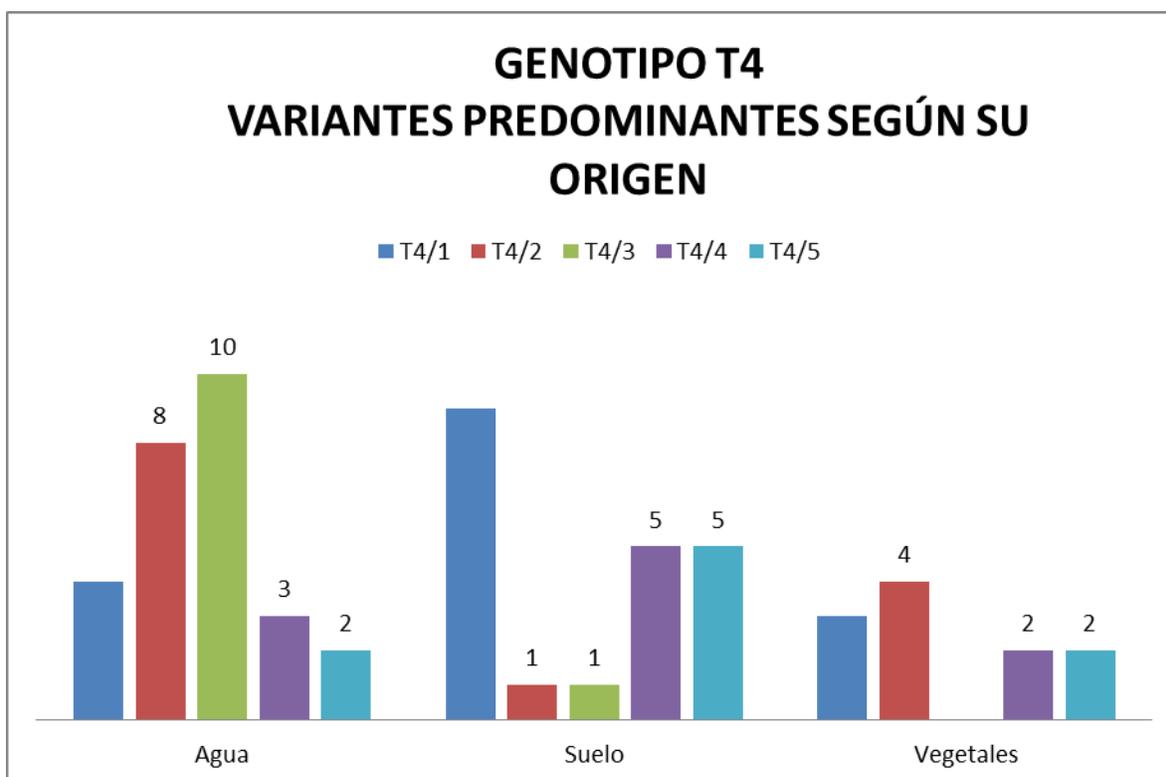
**Figura 14.** Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T4 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. Donde la primera columna es la variante (Var) y la segunda columna es la cantidad de aislados de cada variante (N°). Cada variante detectada presentó un 100% de homología nucleotídica.

**Genotipo T4 DF3**

Var	N°	..... .....  ..... .....  ..... .....  ..... .....  ..... ..... ..... .									
		10		20		30		40		50	
T4/1	16	TTGGCGTCTG	TGTCCCTTTC	AACGGGGGCA	TATGGCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/2	13	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGG-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/3	11	TTGGCGTCGG	T----CTTTC	----GGGGC-	--CGGCGCGG	GGACGGCTTAGCCCGG					
T4/4	10	TTGGCGCGTT	-CGTGTTCAC	G-CACGGGC-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/5	9	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGA-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/6	6	TGGCCGTGCG	TCTCGTTT--	--CGGCGAGG	CGTTTGGCGG	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/7	5	CTGGCTCGTC	---GTCTCAC	GAC---GGC-	----GGGCGG	GGGCGGYTTAGCCCGA					
T4/8	4	TTGGCGT-TC	GGTCCCTTAC	GGGGCCGG--	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/9	4	TTGGCGTGTG	TCGGCTTTC	GGCCGGGGC-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/10	4	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGA-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/11	4	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGA-	----GCGCGA	GGGCGGYTTAGCCCGR					
T4/12	3	TTGGCGTCGG	T----CTTTC	----GGGGC-	--CGGCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/13	3	TTGGCGTCTC	GGTCCCTTAC	GGGGCCGGG-	----GCGCGG	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/14	3	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGG-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/15	3	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGG-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/16	2	CTGGCTCGTC	---GTCTCAC	GAC---GGC-	----GGGCGG	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/17	2	TTGGCGT-TC	GGTCCCTTAC	GGGGCCGG--	----GCGCGA	GGGSGGTTAGCCCGG					
T4/18	2	TTGGCGTCTC	GGTCCCTTAC	GGGGCCGGG-	----GCGCGG	GGGTGGCTTAGCCCGG					
T4/19	2	TTGGCGTCTG	--TCCCTTTC	AACGGGGGCA	---GGGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/20	2	TTGGCGTGTG	--GGCTTTC	GGCCGG--C-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/21	1	CGCGTTCGTG	---TTCACGC	ACG---AGC-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/22	1	CTGGCTCGTC	---GKCTCAC	GAC---GGC-	----SGGCGG	GGGCGGYTTARCCCR					
T4/23	1	CTGGCTCGTC	---GTCTCAC	GAC---GGC-	----GGGCGG	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/24	1	CTGGSTCGTC	---GTCTCAC	GAC---GGC-	----GGGCGG	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/25	1	TGGCCGGGTT	CGTCCCTTCA-	--CGGGGCGG	GTTTCGGCGG	GGGCGGTTAGCCCGA					
T4/26	1	TTGGCGCGTT	-CGTGTTCAC	G-CACGGGC-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/27	1	TTGGCGCGTT	-CGTGTTCAC	G-CACGGGC-	----GCGCGA	GGGSGGTTAGCCCGG					
T4/28	1	TTGGCGTCGG	T----CTTTC	----GGGGC-	--CGGCGCGG	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/29	1	TTGGCGTCGG	T----CTTTC	----GGGGS-	--CGGSGCGS	GGACGGCTTAKMCCCG					
T4/30	1	-----TTGG	CGTCCGTTT-	--CGGC-CGG	C-----GCGG	GGGTGGCTTAGCCCGG					
T4/31	1	TTGGCGTCTC	GGTCCCTTAC	GGGGCCGGG-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/32	1	----TTGGCG	TCTCGGYCCT	T-SRGSGGG	CSGGGCGCGG	GGGTGGCTTAKGCCCG					
T4/33	1	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGA-	----GMGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/34	1	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACGG-	----GSGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/35	1	TTGGCGT-TC	--GTGTTTAC	G---CACRA-	----GCGCGA	GGGCGGTTAGCCCGG					
T4/36	1	TTGGCGT-YS	--GTSTTYMS	G---SRCSR-	----GCGCGR	GGRCGGCTTAGCCCGR					
T4/37	1	TTGGCGYCKG	Y-STGTTSRG	G---CMSGG-	-----GCGC	GGGCGGTTACTTAGG					
T4/38	1	TTGGCGY-KY	KYGTGYTCRC	R-----CRA-	----GSGCGA	GGGAGGTTASTYAGA					
T4/39	1	TTGGCGY-KY	KYGTGYWCRC	R-----CRA-	----GGGCGA	GGGAGGTTASTCCGA					
T4/40	1	TTGGCGY-KY	KYGTTCWCRC	R-----CRA-	----GCGCGA	GGGCGGTTASTCCGA					
T4/41	1	TTGGCKTGTG	--GGCTTTC	RGCCGGSGC-	----GCG--A	GGGSGGTTASTCCCGG					
T4/42	1	YTTGGCKYGTG	TCSKCTTTC	GGCCGGGGG-	----GSGCGA	GGGMMGTTTAKCSCGG					
T4/43	1	-----TTGG	CGTCCGTTT-	--CGGC-CGG	C-----GCGG	GGGTGGCTTAGCCCGG					

El gráfico N° 59, mediante el análisis de la zona variable DF3 se determinó que existen 43 variantes del genotipo T4 en el estudio, siendo las predominantes T4/1 (16 aislados), T4/2 (13 aislados), T4/3 (11 aislados), T4/4 (10 aislados) y T4/5 (9 aislados).

**Gráfico N°59**



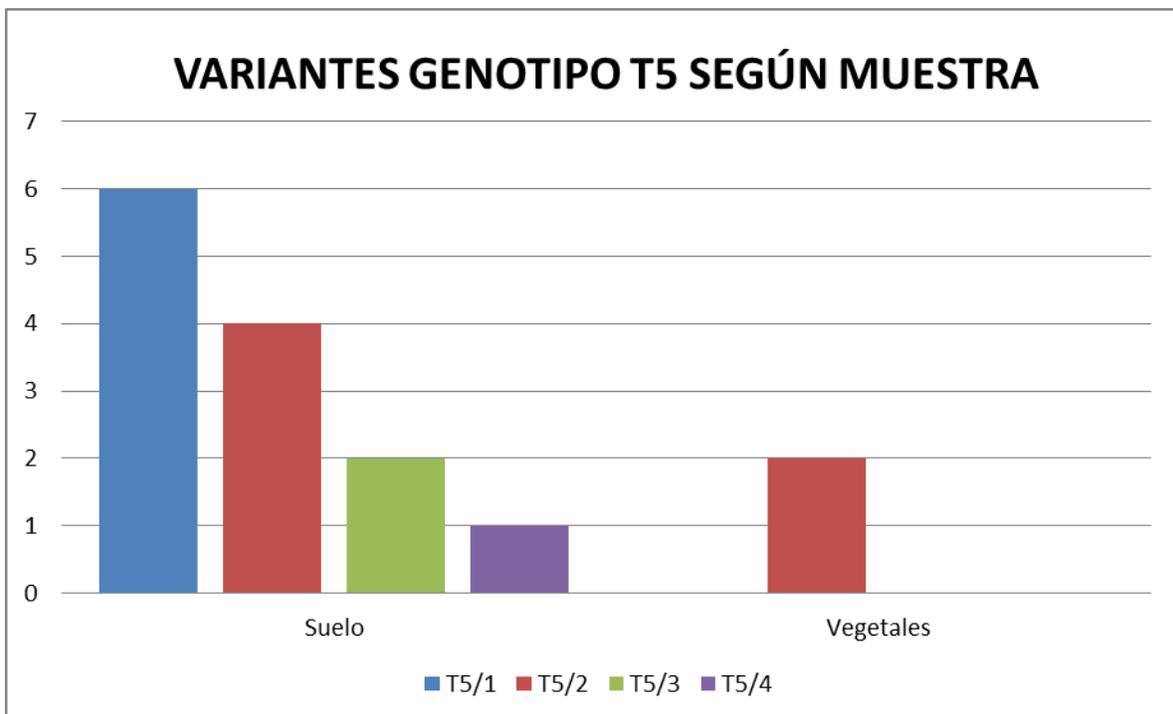
**Figura 15.** Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T5 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. Donde la primera columna es la variante (Var) y la segunda columna es la cantidad de aislados de cada variante (N°). Cada variante detectada presentó un 100% de homología nucleotídica.

### Genotipo T5 - DF3

Var	N°	..... .....  ..... .....  ..... .....  ..... .....  .....			
		10	20	30	40
T5/1	6	CGCCGTTAAT	CCTTT-----	CGGGGGT---	---TAATGGT TGGTG
T5/2	6	CGCTGTTAAT	CCTTT-----	CGGGGGT---	---TAATAGT TGGTG
T5/3	2	CGCCATTGAT	CCTCT-----	CGGGGGT---	---TAATGGT TGGTG
T5/4	1	TGCCGTTGAA	CGTTCACCCG	CAAGGGTGGA	TTTCAACGGT TAGTG

En el gráfico N°60 se observa que mediante el análisis de la zona variable DF3 se determinó que existen 4 variantes en el genotipo T5, siendo las predominantes T5/1 y T5/2 (ambas con 100% de identidad nucleotídica en los 6 aislados presentes).

**Gráfico N°60**



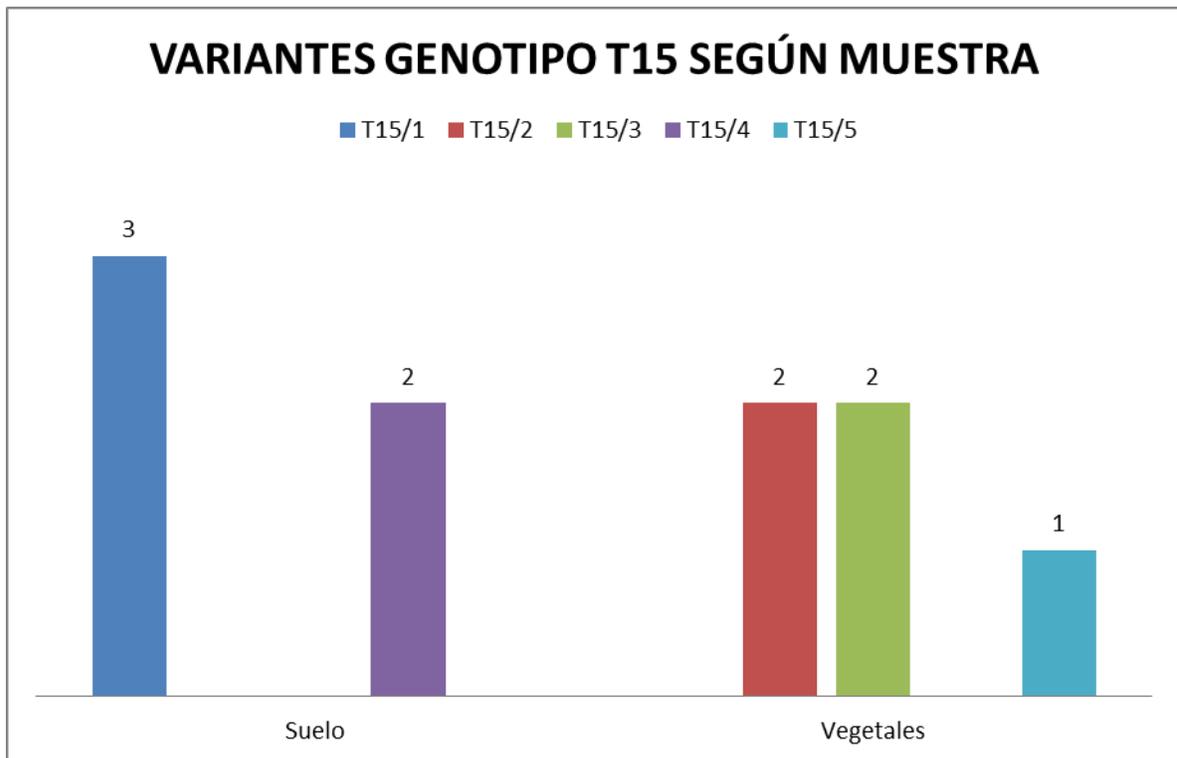
**Figura 16.** Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T15 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. Donde la primera columna es la variante (Var) y la segunda columna es la cantidad de aislados de cada variante (N°). Cada variante detectada presentó un 100% de homología nucleotídica.

### Genotipo T15 - DF3

Var	N°	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....									
		10	20	30	40	50	60	70	80	.....	
T15/1	3	CGGGTCG---	---GCCGTCC	TTGGC----	C GTCGTGCGCG	GCGACGCGCG	CGGCGGCGAG	GGCGGT----	GTCTG-----	----	
T15/2	2	CGGTTCG---	---GCCGTCC	TTGGC----	C GTCGTGCGCG	GCGACGCGCG	CGGCGGCGAG	GGCGGT----	GTCTG-----	----	
T15/3	2	TGGGTCG---	---GCCGTCC	TTGGC----	C GTCGTGCGCG	GCGACGCGCG	CGGCGGCGAG	GGCGGT----	GTCTG-----	----	
T15/4	2	TGGGTCGTGG	CGGGCCGTGC	CCC GCGGTCC	GTCGTGCGCG	GCGACGCGTG	CGGCGGCCAC	GGGGACCGCG	GTCCGTATCA	GCCA	
T15/5	1	-GGGTCG---	---GCCGTCC	TTGGC----	C GTCGTGCGCG	GCGACGCGCG	CGGCGGCGAG	GGCGGT----	GTCTG-----	----	

En el gráfico N°61, mediante el análisis de la zona variable DF3 representa que se determinó la existencia de 5 variantes en el genotipo T15 siendo predominante la variante T15/1 con 3 aislados en un total de 10 muestras, esta variante solo se halló en muestras de suelo.

### Gráfico 61



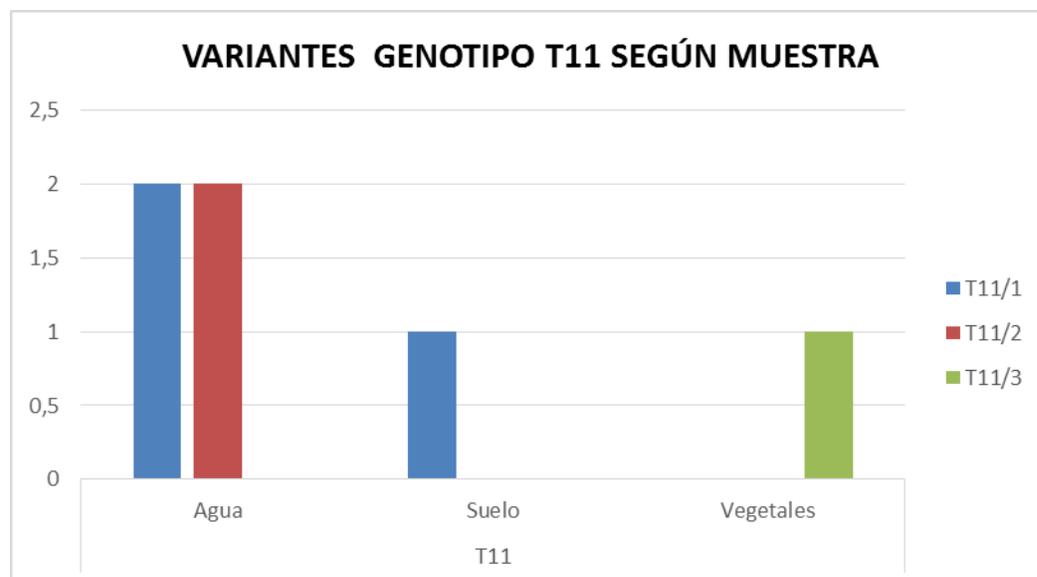
**Figura 17.** Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T11 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. Donde la primera columna es la variante (Var) y la segunda columna es la cantidad de aislados de cada variante (N°). Cada variante detectada presentó un 100% de homología nucleotídica.

### Genotipo T11- DF3

Var	N°	..... ..... ..... ..... ..... .
		10                      20
T11/1	3	GCGTCGY-GG CTTG---CYG CGGCGT
T11/2	2	GCGTCGT-GG CTTG---CTG CGGCGT
T11/3	1	ACATCATTGG CGCAAGCCAG TGGTGG

En el gráfico N° 62 se presenta la existencia de 3 variantes en el genotipo T11, siendo las predominantes T11/1 con 3 aislados de un total de 6 muestras. Esta variante se encontró en muestras de agua y suelo, y contiene nucleótidos ambiguos lo que indicaría una mezcla de distintas variantes.

### Gráfico N°62



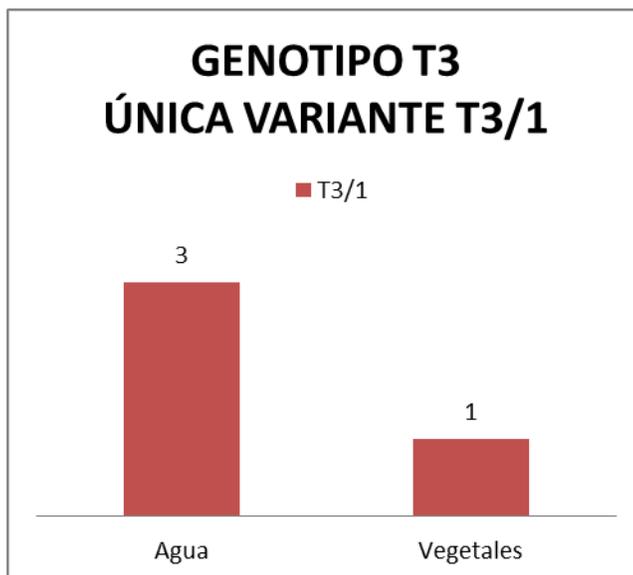
**Figura 18.** Alineamiento nucleotídico de la región variable de DF3 del genotipo T3 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. Donde la primera columna es la variante (Var) y la segunda columna es la cantidad de aislados de cada variante (N°). Cada variante detectada presentó un 100% de homología nucleotídica.

### Genotipo T3 - DF3

Var	N°	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	.....
		10	20	30	40	
T3/1	4	TTTCTGCCAC	CGAATACATT	AGCATGGGAT	AATGGAATAG	GACC

En el gráfico N°63 se observa que todas las muestras identificadas como genotipo T3 presentaron un 100% de similitud nucleotídica para el fragmento ASA.S1 por lo que la zona variable DF3 fue idéntica.

### Gráfico N°63



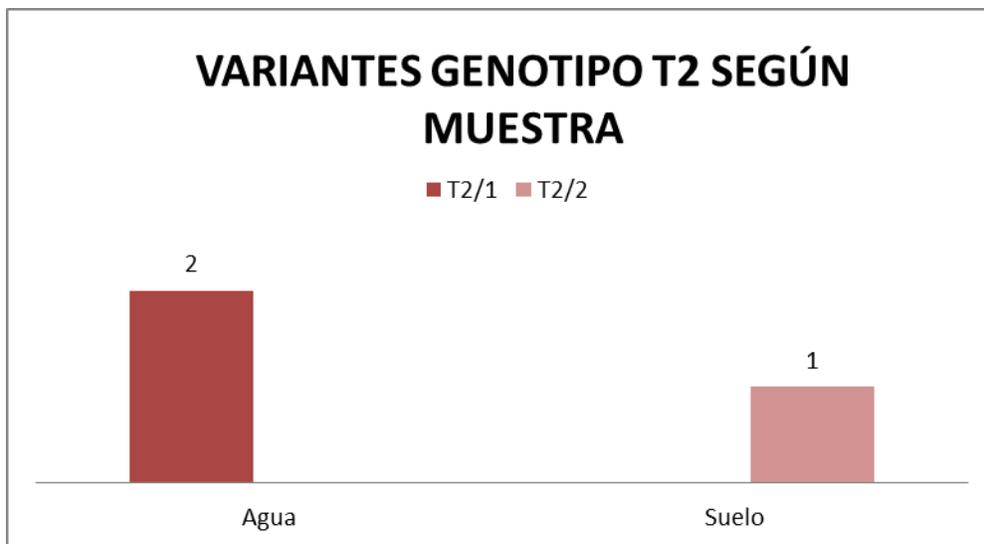
**Figura 19.** Alineamiento nucleótido de la región variable de DF3 del genotipo T2 mediante la herramienta bioinformática ClustalW. Donde la primera columna es la variante (Var) y la segunda columna es la cantidad de aislados de cada variante (N°). Cada variante detectada presentó un 100% de homología nucleotídica.

### Genotipo T2 DF3

Var	N°	..... .....  ..... .....  ..... .....  ..... .....  .....
		10 20 30 40
T2/1	2	A-----TGGT TGTGTATTGT TTGTA
T2/2	1	CATAATTCAG TATATGGCCA GTCAAATGGT TGTATATTGT TTGTG

En el gráfico N°64 mediante el análisis de la zona variable DF3 se determinó que existen 2 variantes en el genotipo T2, siendo las predominantes T2/1 con 2 aislados de un total de 3 muestras.

### Gráfico N°64



**Tabla 8.** Información detallada sobre la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp. de agua en este estudio.

Fuente	N° muestra	N° de muestra en Gbank	Código Gbank	Genotipo	Año
Agua	w-17-2010	CHI17W-10	KT892870	T3	2010
Agua	w-35-2010	CHI35W-10	KT892871	T4	2010
Agua	w-79-2010	CHI79W-10	KT892872	T4	2010
Agua	w-83-2010	CHI83W-10	KT892873	T4	2010
Agua	w-104-2010	CHI104W-10	KT892874	T4	2010
Agua	w-107-2010	CHI107W-10	KT892875	T4	2010
Agua	w-114-2010	CHI114W-10	KT892876	T4	2010
Agua	w-123-2010	CHI123W-10	KT892877	T4	2010
Agua	w-127-2010	CHI127W-10	KT892878	T4	2010
Agua	w-138-2011	CHI138W-11	KT892879	T3	2011
Agua	w-152-2011	CHI152W-11	KT892880	T4	2011
Agua	w-169-2011	CHI169W-11	KT892881	T4	2011
Agua	w-186-2011	CHI186W-11	KT892923	T4	2011
Agua	w-197-2011	CHI197W-11	KT892924	T4	2011
Agua	w-199-2011	CHI199W-11	KT892882	T4	2011
Agua	w-200-2011	CHI200W-11	KT892925	T4	2011
Agua	w-201-2011	CHI201W-11	KT892883	T4	2011
Agua	w-204-2011	CHI204W-11	KT892884	T4	2011
Agua	w-212-2011	CHI212W-11	KT892885	T4	2011
Agua	w-217-2011	CHI217W-11	KT892886	T11	2011
Agua	w-225-2011	CHI225W-11	KT892887	T4	2011
Agua	w-235-2011	CHI235W-11	KT892888	T4	2011
Agua	w-242-2011	CHI242W-11	KT892889	T11	2011
Agua	w-245-2011	CHI245W-11	KT892890	T11	2011
Agua	w-262-2011	CHI262W-11	KT892891	T4	2011
Agua	w-265-2009	CHI265W-09	KT892892	T4	2009
Agua	w-271-2009	CHI271W-09	KT892893	T4	2009
Agua	w-272-2009	CHI272W-09	KT892894	T4	2009
Agua	w-274-2009	CHI274W-09	KT892895	T4	2009
Agua	w-275-2009	CHI275W-09	KT892896	T4	2009
Agua	w-276-2009	CHI276W-09	KT892897	T4	2009
Agua	w-277-2009	CHI277W-09	KT892898	T4	2009
Agua	w-278-2010	CHI278W-10	KT892899	T3	2010
Agua	w-279-2010	CHI279W-10	KT892900	T4	2010
Agua	w-281-2010	CHI281W-10	KT892901	T4	2010
Agua	w-282-2010	CHI282W-10	KT892902	T4	2010
Agua	w-302-2010	CHI302W-10	KT892903	T4	2010
Agua	w-303-2010	CHI303W-10	KT892904	T4	2010
Agua	w-304-2010	CHI304W-10	KT892905	T4	2010

<b>Agua</b>	w-305-2010	CHI305W-10	KT892906	T4	2010
<b>Agua</b>	w-306-2010	CHI306W-10	KT892907	T4	2010
<b>Agua</b>	w-307-2010	CHI307W-10	KT892908	T4	2010
<b>Agua</b>	w-313-2010	CHI313W-10	KT892909	T4	2010
<b>Agua</b>	w-314-2010	CHI314W-10	KT892910	T4	2010
<b>Agua</b>	w-316-2010	CHI316W-10	KT892911	T4	2010
<b>Agua</b>	w-317-2010	CHI317W-10	KT892912	T4	2010

**Tabla 9.** Información detallada sobre la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp. de suelos en este estudio.

Fuente	N° muestra	N° de muestra en Gbank	Código Gbank	Genotipo	Año
Suelo	S-1-2010	CHI1S-10	KT892800	T4	2010
Suelo	S-2-2010	CHI2S-10	KT892801	T4	2010
Suelo	S-3-2010	CHI3S-10	KT892802	T4	2010
Suelo	S-4-2010	CHI4S-10	KT892803	T4	2010
Suelo	S-5-2010	CHI5S-10	KT892804	T4	2010
Suelo	S-6-2010	CHI6S-10	KT892805	T5	2010
Suelo	S-7-2010	CHI7S-10	KT892806	T4	2010
Suelo	S-8-2010	CHI8S-10	KT892807	T4	2010
Suelo	S-9-2010	CHI9S-10	KT892808	T5	2010
Suelo	S-10-2010	CHI10S-10	KT892809	T4	2010
Suelo	S-11-2010	CHI11S-10	KT892810	T4	2010
Suelo	S-12-2010	CHI12S-10	KT892811	T4	2010
Suelo	S-14-2010	CHI14S-10	KT892850	T4	2010
Suelo	S-19-2010	CHI19S-10	KT892851	T4	2010
Suelo	S-20-2010	CHI20S-10	KT892852	T5	2010
Suelo	S-23-2010	CHI23S-10	KT892853	T5	2010
Suelo	S-26-2010	CHI26S-10	KT892854	T4	2010
Suelo	S-27-2010	CHI27S-10	KT892812	T4	2010
Suelo	S-28-2010	CHI28S-10	KT892813	T4	2010
Suelo	S-29-2010	CHI29S-10	KT892814	T4	2010
Suelo	S-30-2010	CHI30S-10	KT892815	T4	2010
Suelo	S-31-2010	CHI31S-10	KT892816	T4	2010
Suelo	S-32-2010	CHI32S-10	KT892817	T5	2010
Suelo	S-33-2010	CHI33S-10	KT892818	T11	2010
Suelo	S-34-2010	CHI34S-10	KT892819	T4	2010
Suelo	S-35-2010	CHI35S-10	KT892820	T4	2010
Suelo	S-36-2010	CHI36S-10	KT892821	T5	2010
Suelo	S-38-2010	CHI38S-10	KT892855	T4	2010
Suelo	S-39-2010	CHI39S-10	KT892856	T4	2010
Suelo	S-41-2010	CHI41S-10	KT892857	T4	2010
Suelo	S-42-2010	CHI42S-10	KT892858	T4	2010
Suelo	S-43-2010	CHI43S-10	KT892859	T4	2010
Suelo	S-44-2010	CHI44S-10	KT892822	T2	2010
Suelo	S-45-2010	CHI45S-10	KT892823	T4	2010
Suelo	S-46-2010	CHI46S-10	KT892824	T4	2010
Suelo	S-48-2011	CHI48S-11	KT892825	T4	2011
Suelo	S-50-2010	CHI50S-10	KT892826	T4	2010

<b>Suelo</b>	S-51-2011	CHI51S-11	KT892827	T5	2011
<b>Suelo</b>	S-53-2011	CHI53S-11	KT892828	T15	2011
<b>Suelo</b>	S-54-2011	CHI54S-11	KT892829	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-55-2011	CHI55S-11	KT892830	T15	2011
<b>Suelo</b>	S-56-2011	CHI56S-11	KT892845	T15	2011
<b>Suelo</b>	S-58-2009	CHI58S-09	KT892831	T5	2009
<b>Suelo</b>	S-59-2009	CHI59S-09	KT892832	T4	2009
<b>Suelo</b>	S-64-2011	CHI64S-11	KT892833	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-66-2011	CHI66S-11	KT892834	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-67-2011	CHI67S-11	KT892835	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-68-2011	CHI68S-11	KT892860	T5	2011
<b>Suelo</b>	S-70-2011	CHI70S-11	KT892861	T5	2011
<b>Suelo</b>	S-71-2011	CHI71S-11	KT892862	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-72-2011	CHI72S-11	KT892863	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-73-2011	CHI73S-11	KT892864	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-74-2011	CHI74S-11	KT892865	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-75-2011	CHI75S-11	KT892866	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-76-2011	CHI76S-11	KT892867	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-78-2011	CHI78S-11	KT892868	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-79-2011	CHI79S-11	KT892869	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-80-2011	CHI80S-11	KT892836	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-82-2011	CHI82S-11	KT892837	T5	2011
<b>Suelo</b>	S-83-2011	CHI83S-11	KT892838	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-85-2011	CHI85S-11	KT892926	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-87-2011	CHI87S-11	KT892839	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-92-2011	CHI92S-11	KT892840	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-93-2011	CHI93S-11	KT892841	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-94-2011	CHI94S-11	KT892842	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-95-2011	CHI95S-11	KT892843	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-97-2011	CHI97S-11	KT892844	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-98-2011	CHI98S-11	KT892846	T5	2011
<b>Suelo</b>	S-99-2011	CHI99S-11	KT892847	T15	2011
<b>Suelo</b>	S-100-2011	CHI100S-11	KT892848	T15	2011
<b>Suelo</b>	S-101-2011	CHI101S-11	KT892849	T5	2011
<b>Suelo</b>	S-13-2011	CHI13S-11	KT892762	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-17-2011	CHI17S-11	KT892763	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-25-2011	CHI25S-11	KT892764	T4	2011
<b>Suelo</b>	S-57-2011	CHI57S-11	KT892765	T4	2011

**Tabla 10.** Información detallada sobre la genotipificación de los aislados de *Acanthamoeba* spp. de vegetales en este estudio.

Fuente	N° muestra	N° de muestra en Gbank	Código Gbank	Genotipo	Año
Vegetales	V-4-2010	CHI4V-10	KT892774	T15	2010
Vegetales	V-6-2010	CHI6V-10	KT892775	T15	2010
Vegetales	V-9-2010	CHI9V-10	KT892776	T15	2010
Vegetales	V-13-2010	CHI13V-10	KT892777	T15	2010
Vegetales	V-14-2010	CHI14V-10	KT892778	T3	2010
Vegetales	V-16-2010	CHI16V-10	KT892779	T4	2010
Vegetales	V-19-2010	CHI19V-10	KT892773	T15	2010
Vegetales	V-24-2010	CHI24V-10	KT892780	T4	2010
Vegetales	V-25-2010	CHI25V-10	KT892781	T4	2010
Vegetales	V-30-2010	CHI30V-10	KT892782	T5	2010
Vegetales	V-34-2010	CHI34V-10	KT892783	T4	2010
Vegetales	V-35-2010	CHI35V-10	KT892784	T11	2010
Vegetales	V-36-2010	CHI36V-10	KT892785	T5	2010
Vegetales	V-41-2011	CHI41V-11	KT892786	T4	2011
Vegetales	V-43-2011	CHI43V-11	KT892787	T4	2011
Vegetales	V-45-2011	CHI45V-11	KT892788	T4	2011
Vegetales	V-46-2011	CHI46V-11	KT892789	T4	2011
Vegetales	V-48-2011	CHI48V-11	KT892790	T4	2011
Vegetales	V-49-2011	CHI49V-11	KT892791	T4	2011
Vegetales	V-51-2011	CHI51V-11	KT892792	T4	2011
Vegetales	V-53-2011	CHI53V-11	KT892793	T4	2011
Vegetales	V-56-2011	CHI56V-11	KT892794	T4	2011
Vegetales	V-58-2011	CHI58V-11	KT892795	T4	2011
Vegetales	V-59-2011	CHI59V-11	KT892796	T4	2011
Vegetales	V-65-2011	CHI65V-11	KT892797	T4	2011
Vegetales	V-66-2011	CHI66V-11	KT892798	T4	2011
Vegetales	V-69-2011	CHI69V-11	KT892799	T4	2011
Vegetales	V-10-2011	CHI10V-11	KT892757	T4	2011
Vegetales	V-20-2011	CHI20V-11	KT892758	T4	2011
Vegetales	V-52-2011	CHI52V-11	KT892759	T4	2011
Vegetales	V-54-2011	CHI54V-11	KT892760	T4	2011
Vegetales	V-60-2011	CHI60V-11	KT892761	T4	2011



## ***DISCUSIÓN***



## IV DISCUSIÓN

---

El territorio de la República de Chile es largo y angosto, con una longitud de 4.300 km, característica esta que junto a su ubicación entre el mar y cordillera, son factores que son determinantes en la variedad de clima. La extensión latitudinal de Chile determina que la temperatura media disminuya 11,7°C entre las ciudades de Arica (primera ciudad del norte) y Punta Arenas (ciudad del extremo sur). La influencia del océano Pacífico y de la corriente marina fría de Humboldt hacen posible que las temperaturas de norte a sur disminuyan en forma gradual, homogeneizándolas, es decir, permiten que las temperaturas del norte sean más bajas y las del sur más altas que en otros países que están a igual latitud.

La diversidad climática es observable por la frecuencia de las lluvias, las cuales se hacen notablemente más intensas a medida que se avanza hacia el sur. La época de lluvia también varía según las regiones. En el altiplano Tarapaqueño caen en verano, en invierno en el Norte Chico y todo el año desde Valdivia al sur.

En la formación de los suelos en Chile, intervienen una serie de factores, entre los que destaca la gran extensión latitudinal del país, implicando diferentes condiciones climáticas y ambientales, por lo tanto, diferentes tipos de suelo. Uno de los principales peligros que podría ocasionar un suelo contaminado sería la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas y, por tanto, también de los cultivos y animales de granja, por utilización de dichas aguas para regadío de alimentos de huerta y pastos. (CONAMA, 1994).

Las características del clima y ambientales también influyen, en la variedad de la disponibilidad del recurso hídrico, que abunda en la zona sur.

Las muestras incorporadas en este estudio, fueron tomadas tanto en regiones con precipitaciones casi inexistentes, como de lugares donde estas son diarias y abundantes. El Norte Grande es la región árida del país, donde se encuentra el Desierto de Atacama, uno de los más secos del mundo. El Norte Chico se

caracteriza por los grandes valles transversales que se extienden de cordillera al mar, con un clima semiárido, mientras que la región del Valle Central disfruta de un clima templado. En la región de los canales el clima es de lluvia y nieve. En las muestras de suelo, estas fueron tomadas tanto en suelos áridos como el que se encuentra en el Desierto de Atacama, hasta en el sur donde existe una abundante vegetación. También se tomaron muestras a nivel del mar y muestras a 4.200 m sobre el nivel del mar, como es el caso de los Geiser del Tatio o el Salar de Atacama a 2.300 m sobre el nivel del mar. Además, dichas muestras no sólo fueron tomadas en Chile continental, sino que también en Chile Insular, en ciudades de la Isla de Chiloé y en Isla de Pascua, entre ellas agua del Volcán Rano Kao, encontrando muestras positivas en ambas Islas.

Las temperaturas ambientales mínimas y máximas obtenidas en los días de muestreo fueron: mínima  $-3^{\circ}\text{C}$  y máxima  $35^{\circ}\text{C}$ , lo que indica la diversidad de este parámetro en las diferentes zonas del país.

Las muestras seleccionadas en el estudio fueron de una gran variedad de aguas, suelos y vegetales, sumando un total de 532, las que estuvieron constituidas por 362 (68%) muestras de agua, 99 (19%) muestras de suelo y 71 (13%) muestras de vegetales. Los números reflejan la mayor facilidad de incorporar muestras de agua en el estudio, en los casos de colaboración en la toma de muestras por personas voluntarias, generalmente de Regiones alejadas de la Región Metropolitana, era difícil que además de muestras de agua trasladaran suelos y vegetales. Otro caso lo presentaron las muestras de agua de piscinas, las que generalmente se encontraban en un recinto de concreto, por lo tanto, no existió la posibilidad de muestras de suelo.

En el análisis morfológico de las 532 muestras incluidas en este estudio, el 50% (266/532) fueron positivas a AVL y del total de las muestras, el 32% (170/532) correspondió a *Acanthamoeba* spp. En el 28% (47/170) de las muestras los cultivos fueron mixtos y en el 72% (123/170) se identificaron sólo *Acanthamoeba* spp. En el 18% (96/532) de las muestras sólo se encontraron otras AVL las que deberían ser identificadas molecularmente, existiendo la probabilidad de

identificar otras *Acanthamoeba* spp. por la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares. Se encontraron muestras positivas desde Arica, extremo norte y en Punta Arenas, extremo sur, por lo cual fue posible aislar el protozoo en diversidad de aguas, suelos y vegetales.

## **A. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS TOTALES**

### **1. Análisis morfológico en la totalidad de las muestras**

**1.1 Análisis de las muestras por Regiones:** en el estudio general, se observó que en todas las regiones se encontraron muestras positivas. Los mayores porcentajes se encontraron en Regiones del norte, XV y IV, en el centro en la VII Región y en la Región VIII ubicada en el sur, el menor porcentaje se obtuvo en la II Región ubicada en el norte. Si comparamos las Regiones del extremo norte y extremo sur, se obtuvieron los siguientes resultados: en el extremo norte, Región Arica-Parinacota se encontró un 60 % de positividad (6/10), todas las muestras fueron de agua, genotipo T4. En la ciudad de Arica de esta región, la temperatura atmosférica promedio mínima de los días en que se tomaron muestras fue de 17,4°C y la temperatura promedio máxima de 23,7°C, con precipitaciones de 1.5 mm/m<sup>2</sup> anual. En el extremo sur, Región de Magallanes y de la Antártica Chilena, se analizaron 8 muestras, encontrando 1 positiva (12,5%), que correspondía a una muestra de suelo, de la ciudad de Punta Arenas de esta Región. La temperatura atmosférica promedio mínima en este punto fue de 2,4°C y la temperatura promedio máxima de 10,7°C, con precipitaciones 395,3 mm/m<sup>2</sup> anual. La ameba aislada perteneció al genotipo T5, Aunque las Regiones tienen climas totalmente distintos, se puede observar que en la región del norte la positividad es muy diferente a la Región del sur, esta última con condiciones climáticas extremas, pero aún así es posible encontrar *Acanthamoeba* spp. en ella. Analizando Regiones con número de muestras parecidas, como es caso de la II Región Antofagasta y la penúltima Región del Sur, la XI Región del Aysén, se observa que en la II Región se encontró un 6,9% (2/29) de positividad. En la ciudad de Antofagasta de esta Región, la temperatura promedio mínima es de

11,9°C y la promedio máxima de 20,2°C, tiene precipitaciones 2 mm/m<sup>2</sup> anual. En la Región de Aysén se encontró un 38% (9/24) de positividad. En la ciudad de Aysén de esta Región las temperaturas promedio mínima de 4,0°C y de promedio máxima 12,3°C, precipitaciones 2.961mm/m<sup>2</sup> anual, (Dirección Meteorológica de Chile). Estos resultados ratifican que *Acanthamoeba* puede sobrevivir en duras condiciones ambientales, (Siddiqui et al, 2012).

**1.2 Análisis de las muestras por Zonas:** en la clasificación de las muestras por zonas, los porcentajes obtenidos del número de muestras del estudio, están relativamente aproximados a la distribución poblacional del país de acuerdo al censo del 2012 (INE, 2012), según el cual, en la zona norte se encuentra el 12% de la población. Aquí se tomaron el 16% de muestras. En la zona centro se encuentra el 62% de la población y por lo tanto se tomó el 64% de las muestras y en la zona sur se encuentra el 26% de la población, habiendo tomado allí el 20% de las muestras. De acuerdo a estos datos, los porcentajes de censo de población, con los porcentajes de las muestras tomadas en las diferentes zonas estuvieron en cifras similares. La distribución poblacional nos indica la posibilidad y oportunidad de tomar las muestras, en lugares habitados, cercanos o en caminos, de una comuna a otra. Los resultados de positividad obtenidos de 28% en el norte, 33% en el centro y 31% en el sur, no mostraron diferencias significativas ( $\chi^2=0,93$ ; p-valor=0,63), confirmando la ubicuidad de *Acanthamoeba* spp. y su capacidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales, (Khan N.A., 2006).

**1.3 Estacionalidad:** en el análisis de estacionalidad los resultados indicaron que en otoño se obtuvo el menor porcentaje de positividad, resultando significativamente diferente al resto de las estaciones, ( $\chi^2= 14,53$ ; p-valor=0,0023). Por ello se analizó el promedio de las temperaturas mínimas y máximas de los días en que se tomaron las muestras y el número de muestras agrupadas por las 3 zonas del país en otoño e invierno que es la estación que presentó un 33% de positividad. En otoño el promedio de temperatura mínima fue de 8,3°C y la máxima de 18,3°C, en invierno 5,7 la mínima y 15,7 la máxima. En relación a la toma de muestras por ubicación en zona norte, centro y sur, los

datos indicaron que en otoño, en la zona sur se tomó el mayor porcentaje de muestras que fue de 44%. En invierno, se obtuvo el 35% de las muestras en esa misma zona. Sin embargo, al analizar estos datos, en invierno se encontraron las temperaturas promedio más bajas y el porcentaje de positividad fue de 33%, mientras que en otoño se encontró un 19% de positividad y presentó temperaturas promedio más altas. Investigadores dicen que los rangos de *Acanthamoeba* spp. detectados en diferentes lugares puede ser influenciado por el tipo de agua y condiciones geográficas (Kao et al, 2013). Totalmente distintos fueron los resultados obtenidos en un estudio realizado en una planta de tratamiento de aguas residuales, en el cual, la mayor cantidad de aislamientos de *Acanthamoeba* spp. ocurrió en otoño, (Muchesa et al, 2014). Lo mismo ocurrió en un estudio realizado en España, en Plantas de Tratamiento de Agua donde encontraron que en el depósito 1 aislaron más amebas en invierno, mientras que en los depósitos 2 y 3 la prevalencia fue más alta en otoño, contrario a lo que ocurrió en este estudio, (García et al, 2013).

**1.4 Clasificación de Pussard y Pons:** en esta experiencia, los valores encontrados en las mediciones del total de las muestras fueron: medición mínima correspondió a 9,44 $\mu$ m y la máxima a 25,5 $\mu$ m, las *Acanthamoeba* spp. aisladas fueron incorporadas en los Grupos II y III. En un estudio realizado en muestras de suelo y agua los diámetros de los quistes midieron entre 10,6 $\mu$ m a 16,4 $\mu$ m, los aislados fueron incorporados en los Grupos II y III (Alves et al, 2012).

## **1.5 Termotolerancia**

**1.5.1 Termotolerancia a 42°C:** en este trabajo los cultivos en un inicio se incubaron a 25°C y 37°C, posteriormente se efectuaron incubaciones a temperaturas de 42°C y a 60°C. Todos los cultivos resultaron positivos a 42°C, algunos cultivos tenían un crecimiento en toda la placa de cultivo y otros parcialmente, en los 7 días de incubación, incluso se observó crecimiento en los cultivos que inicialmente fueron aislados en incubación a 25°C y que posteriormente crecieron lentamente en incubación a 37°C. Una experiencia distinta obtuvieron Kiss et al, 2014 cuyos cultivos incubados a 42°C fueron todos

negativos. Algunos investigadores plantean su termotolerancia a temperaturas sobre los 30°C y menos de 40°C. (Muchesa et al, 2014). En un estudio en agua los cultivos se incubaron a 30°C y 37°C, el 55% creció a esta última temperatura. (Alves et al, 2012). En otro estudio en un sistema de tratamiento de residuos industriales, la termotolerancia se hizo a 30°C y 37°C, los resultados obtenidos fueron que a 30°C tuvieron 20 aislados, a 37°C 31 aislados. (Ramírez et al, 2014).

**1.5.2 Termotolerancia a 60°C:** el estudio de termotolerancia realizado a las 170 muestras positivas, con cultivos incubados a 60°C, fueron todas negativas. De acuerdo a estudios de termotolerancia, se observa que en varios de ellos los estudios se limitan a temperaturas máximas entre 40 a 47°C, (Leiva et al, 2008) sin embargo, hay unos pocos estudios, como el de Coşkun et al, 2013, en que además incubaron los cultivos a 52°C, obteniendo un 18% (7/33) de crecimiento. En una tesis se analizó la viabilidad de *Acanthamoeba* spp. después de la exposición a 70°C durante 1 hora, este estudio incentivó a realizar termotolerancia de las amebas a 60°C con el fin de observar viabilidad a esa temperatura, teniendo presente que con las temperaturas de 37°C y 42°C ya habíamos establecido el posible factor patógeno de las amebas en estudio (Tesis de OlgaTovar, 2006).

**1.5.3 Temperatura de aislamiento de *Acanthamoeba* spp:** en este trabajo los cultivos se incubaron a temperaturas de 25°C y 37°C, obteniéndose un 94% de aislamientos del protozoo a ambas temperaturas, en 8 muestras los cultivos fueron positivos sólo a 25°C, esto nos indicaría que incubando los cultivos sólo a 25°C sería suficiente, sin embargo, en un 1% (2 muestras) el aislamiento sólo se produjo en cultivo incubado a 37°C. Temperaturas similares de incubación fueron empleadas por Jeong HJ, 2007. Los 8 cultivos positivos inicialmente sólo a 25°C se subcultivaron y fueron incubados a 37°C, fue difícil lograr el crecimiento, sin embargo, después de varios subcultivos y semanas se logró, pasando a incrementar el grupo de *Acanthamoeba* spp. potencialmente patógenas. De igual forma los cultivos positivos sólo a 37°C se subcultivaron e incubaron a 25°C, lográndose una pronta recuperación de la *Acanthamoeba* spp. Entre 25°C y 30°C

son las temperaturas más utilizadas para aislamiento, se ha descrito que si las *Acanthamoeba* spp. crecen a 37°C son potencialmente patógenas. (Walochnik et al, 2000; Ghadar-ghadar et al, 2012; Kiss et al, 2014).

**1.5.4 Día de positividad del cultivo:** en los cultivos a 25°C, a las 24 horas dieron positivo 12 cultivos, entre los 2 y 4 días dieron positivo el 70% (117/168), a partir del 5° día disminuyeron los porcentajes de positividad, llegando al día 10, con 1 cultivo positivo. La prueba de Kruskal-Wallis resultó no significativa, al comparar los tiempos que tardaron en crecer los diferentes genotipos.

En los cultivos a 37°C, en el primer día fueron positivos 23 cultivos, los días de mayor positividad estuvieron entre el día 2 y 3 con un 54% (87/162), los días 8 al 10 tuvieron 1 cultivo positivo cada uno, La prueba de Kruskal-Wallis resultó no significativa. En un caso, el olvido de eliminar las placas negativas, hizo que al revisarlas el día 13 se encontró 1 positiva, esta experiencia indica que si se dejan en incubación los cultivos por 15 días, se podría aumentar la sensibilidad del cultivo debido a que se podría detectar un mayor número de casos positivos. El tiempo de incubación de 10 días en este estudio se realizó basado en la experiencia de diagnóstico rutinario en casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. realizado anteriormente, al revisar estos datos en la literatura disponible, los días de incubación fluctuaron entre 3 días a más de un mes, en vista de estos datos se decidió en el futuro realizar las incubaciones durante 15 días. En un estudio en suelo realizado en Irán, los quistes se detectaron después de 1 semana y en algunos casos después de 1 mes. (Rezaeian et al, 2008; Adamska et al, 2014; Ghadar-ghadar et al, 2012), 1 ó 2 semanas fue lo más frecuente. (Baquero et al, 2014; Tanveer et al, 2013; Laconte et al, 2013).

En relación al riesgo para la salud del ser humano por este protozoo, algunas *Acanthamoeba* spp., son patógenas y que además de ser activos posibles agentes de queratitis y EGA, pueden transmitir numerosos microorganismos, virus, bacterias, (Kiss et al, 2014). Este segundo aspecto se refiere a la endosimbiosis, en el cual *Acanthamoeba* spp. se alimenta de bacterias del

ambiente capturándolas dentro de su citoplasma, en un proceso conocido como fagocitosis. Las bacterias fagocitadas son usualmente lisadas y digeridas por la ameba, sin embargo, algunas especies de bacterias pueden crecer y reproducirse dentro del citoplasma y llegar a ser simbioses. La relación simbiótica beneficia a ambos organismos, la supervivencia y virulencia de ambos organismos puede ser aumentada por esta relación, (Nwachuku, 2003). Las AVL sirven como hospedador de un gran número de agentes biológicos patógenos para humanos y puede aumentar la virulencia de algunas bacterias llamadas microorganismos resistentes a las amebas (ARMs), *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* spp, *Cryptococcus neoformans*, etc. También pueden ser hospederos de ooquistes de protozoo parásito *Cryptosporidium*, algunos de estos microorganismos son capaces no sólo de sobrevivir la digestión de la ameba sino también de proliferar dentro de ellas, siendo un riesgo asociado a la patogenicidad que pudiera provocar *Acanthamoeba* spp. (Lass et al, 2014; Coşkun, 2013).

En Chile, en 1981, se aisló por primera vez, en el ISP, en una muestra de agua, una *Acanthamoeba* spp. y correspondió a *Acanthamoeba palestinensis* confirmada en el Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Estados Unidos (Herskovic y col, 1989). En la siguiente década, en 1993, nuevamente en el ISP se aisló *Acanthamoeba polyphaga* en una paciente con queratitis bilateral usuaria de lentes de contacto, también confirmada en el CDC, (Astorga y col, 1993). Hasta 1999, se habían diagnosticado 18 casos en Chile (Astorga y col, 2007). Al igual que en todos los países, los casos de queratitis están en la curva ascendente directamente relacionada al aumento de usuarios de lente de contacto. Los 2 casos publicados sobre EGA han sido hallazgos en autopsia y el agente causal fue otra AVL, *Balamuthia mandrillaris*. (Cuevas y col, 2006: Oddo y col 2006).

## **2. Análisis molecular de *Acanthamoeba* spp. en la totalidad de las muestras.**

En algunos estudios no se logra realizar la confirmación por PCR y secuenciar el total de las muestras lo que quizás podría ser por no lograr un buen producto morfológico o por el gran problema que ocasiona la contaminación especialmente por hongos (Lares et al, 2001), o porque no logran el crecimiento de *Acanthamoeba* spp. en cultivo axénico, (Todd et al, 2015), en este trabajo no se axenizaron los cultivos y se logró la secuenciación del 100% de las muestras positivas.

En este estudio fueron 6 los genotipos identificados en las 170 muestras positivas, de mayor a menor porcentaje fueron T4 con un 78%, T5 con un 9%, T15 con un 6%, T11 con un 3% y T2 y T3 con un 2%. Al analizarlos por tipo de muestras, los genotipos T4 y T11 se encontraron en aguas, suelos y vegetales. En relación a los genotipos por Regiones, el genotipo T4 fue único en 7 de ellas y la Región en que se encontraron todos los genotipos fue en la XIII que corresponde a la Región Metropolitana. En relación a los genotipos por zonas, los genotipos T4, T5 y T15 se identificaron en todas las zonas. Los genotipos analizados por estaciones del año, los genotipos T4 y T5 se identificaron en todas las estaciones.

Todos los genotipos aislados en este trabajo se han identificado en casos clínicos y los resultados indican que se encuentran en todas las Regiones de Chile continental y también en Chile insular. Los 6 genotipos han sido aislados en casos de queratitis y los genotipos T2, T4, T5 y T15 además, en EGA. De acuerdo a la información revisada son 8 los genotipos que han sido encontrados en pacientes con queratitis T2, T3, T4, T5, T6, T11, T13 y T15 (Grün et al, 2014; Lass et al, 2014;). Los genotipos T1, T2, T4, T5, T10, T12, T15 y T18 son productores de EGA. (Adamska et al, 2014). Se ha descrito que el genotipo T4, es el primero asociado a queratitis por *Acanthamoeba*, el segundo es T3 y el tercero T11, (Maciver et al, 2013), además los estudios han mostrado que el 90% de los aislados de *Acanthamoeba* spp. que producen infección pertenecen al grupo T4. (Lorenzo-Morales et al, 2006). Se ha indicado que las cepas

termotolerantes que crecen a 37°C son capaces de causar queratitis (la temperatura del ojo es 34°C), aislados que toleran 42°C pueden causar EGA (Walochnik, 2000). (Kiss et al, 2014). Los 6 genotipos del estudio crecieron a 37°C y a 42°C, por lo cual podrían ser un potencial riesgo de salud pública. Hay un acuerdo general que queratitis y EGA han aumentado significativamente en los últimos 10 años en los Estados Unidos, por el aumento de usuarios de lentes de contacto en todas las edades y por el aumento de individuos inmunosuprimidos. (Nwachuku et al, 2003).

En el caso de infección del sistema nervioso central, los casos de EGA por *Acanthamoeba* son infrecuentes, ocurren en personas inmunosuprimidas y ocasionalmente en personas inmunocompetentes, (Parija et al, 2015). Los casos de EGA por *Acanthamoeba* spp. pueden ocurrir en cualquier época del año y no tiene relación con exposición a agua dulce. El diagnóstico de EGA es difícil porque no tiene síntomas específicos y puede ser fácilmente confundida con otras enfermedades bacterianas y virales. Un aumento en el número de casos deberían ser esperados en los países en desarrollo, especialmente en África sub-Sahariana, Asia del sur donde la epidemia de VIH es próspera, además por limitados especialistas en el diagnóstico en muchos de estos países, escasez de recursos, bajas tasas de autopsias, (Visvesvara G., 2013).

## **B. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA**

### **1. Análisis de aspectos generales sobre la diversidad de metodologías de toma de las muestras y procesamientos.**

En estudios ambientales se encuentra una gran diversidad de procesamiento de las muestras, desde la toma de las muestras hasta las metodologías de análisis, lo que hace difícil la comparación de los resultados de diferentes investigadores, (Magnet et al, 2012), basado en esto, otros investigadores preocupados por esta

diversidad, realizaron una revisión con el fin de impulsar la estandarización de las metodologías analíticas, (Goñi et al, 2014).

A continuación se analizará la diversidad de los aspectos técnicos del diagnóstico fenotípico que están involucrados en el resultado final del análisis, basada en algunas de las publicaciones en área ambiental a las que se tuvo acceso.

### **1.1 Toma de las muestras**

Uno de los factores importantes en la detección de *Acanthamoeba* spp., es la cantidad de muestra tomada, de acuerdo a lo revisado se observó gran diversidad al respecto, aún existiendo algunas normativas como la del Standard Method for the Examination of Water and Waste Water, 9711 C, 2005, normativa de la EPA (Health Protection Agency), National Standard Method W17, issue 2. UK. "Isolation and identification of *Acanthamoeba*", 2004. NOM-245-SSA1-2010, Norma Oficial Mexicana, Documento técnico PNT-IO-02, 2008, "Procesamiento de muestras oculares para detección y cultivo de *Acanthamoeba* spp." Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.

En este estudio, la cantidad de muestra de agua se decidió basada en el Standard Method, 2005, que establece un rango entre 10 a 1000 ml, de acuerdo a esto se decidió tomar 200 ml de muestra de agua, por la disponibilidad en ese momento de envases de 100 ml, las muestras se tomaron entre 10 a 20 cm de profundidad, procesadas en 100 ml e incubadas a 25°C y 37°C. En algunas de las publicaciones revisadas relacionadas a este aspecto, se observaron algunas variaciones en la cantidad de toma de muestra como: 50 ml, (Leiva et al., 2008), 100 ml, (Lass et al., 2014); 200 ml, (Adamska et al., 2014), 250 a 450 ml, (Nazar et al, 2011), 500 ml, (Boost et al., 2008), 1000 ml, (Ramírez et al., 2012), 2000 ml, (Kao et al., 2012), 3000 ml, (Al-Herrawy et al., 2013), 10 litros, (Fluviá et al, 1983), 50 litros y 100 litros, estas dos últimas en plantas de tratamiento de agua, (Magnet et al., 2013), incluso se ha tomado muestra de agua mediante un hisopo con gasa estéril, (Garaycochea et al., 2008), también se han utilizado envases

para tomar las muestras conteniendo tiosulfato de sodio con el fin de neutralizar el cloro, (Muchesa et al, 2014).

## **1.2 Análisis de aspectos metodológicos**

### **1.2.1 Metodologías de concentración de las muestras y medios de cultivo.**

La metodología empleada en este trabajo estuvo basada en la descrita en el Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 21 st Edition, 2005, Método 9711. El análisis se realizó en duplicado con el fin de efectuar incubaciones de los cultivos a 25°C y 37°C.

En relación a las metodologías de análisis empleadas en diferentes investigaciones, existe también una gran variedad, pocos emplean las metodologías estandarizadas por los organismos internacionales anteriormente descritos u otros. En la mayoría de los estudios revisados realizan la concentración del agua por método de filtración con filtros de nitrocelulosa de diferentes tamaños de poro, habiendo encontrado los que utilizan filtros de 0,45µm de poro (Rhadar et al, 2012), poro de 0,2µm (Tanveer et al, 2013), poro de 0,22µm, (Huang S-W et al, 2010) poro de 1.2µm (Init et al, 2010), filtros whatman 42 y centrifugación (Mosayebi et al, 2013) (Wannasan et al, 2013), filtrado en doble gasa y centrifugación, (Laconte et al, 2013) e incluso otros autores analizan las muestras sin concentrar, (Kilvington et al, 2004). En relación a lo descrito anteriormente, la metodología más utilizada es el filtro de nitrocelulosa de 0,45µm de poro, que normalmente se deposita en forma invertida directamente sobre la placa con medio de cultivo. Como variante algunos raspan el filtro y el raspado se lava con un buffer, centrifugando después y posteriormente siembran gotas del sedimento en medio de cultivo, (Kao et al, 2012). El medio de cultivo universalmente utilizado es el Agar No Nutriente (ANN), excepcionalmente se ha utilizado Medio YAS (Alves et al, 2012), Agar Myast y Agar Metropolitano. (Suárez et al., 2002).

### **1.2.2 Bacterias utilizadas en la preparación del medio de cultivo.**

La mayoría de los investigadores siembra la muestra en placa con agar no nutritivo (ANN) cubierto con una suspensión de *Escherichia coli* muerta por calor (Maschio et al., 2015) o viva (Herskovic et al, 1989). En un estudio realizado en aguas de una planta de tratamiento, realizaron cultivo con bacteria *Escherichia coli* muertas preparando una suspensión de cultivo la que se deposita en un baño con agua hirviendo por 20 minutos, inmediatamente antes del uso. Los mismos autores compararon el crecimiento de las amebas en cultivo con *Escherichia coli* vivas y muertas, no encontrando diferencia significativa, (Muchesa et al., 2014), El procedimiento más utilizado supone el mantenimiento de una suspensión de *E. coli* en suero fisiológico a 65°C durante al menos 15 minutos. Además de esta bacteria también se ha utilizado como alimento para las amebas: *Enterobacter aerógenes*, (Garaycochea et al., 2008), *Enterobacter cloacae*, (Brown et al, 1982), *Proteus mirabilis*, (Napolitano J., 1982).

### **1.2.3 Medio de cultivo axénico**

Algunos investigadores, después de aislar *Acanthamoeba* spp. en medio monoxénico, transfieren un trozo de cultivo positivo a un medio axénico, aunque este pasaje no siempre se logra o bien requiere de mucho tiempo, como es el caso de necesitar 10 a 12 meses para lograr el crecimiento de *Acanthamoeba* spp. De hecho, la capacidad para crecer en medio axénico es considerada como un factor de virulencia. El medio de cultivo más utilizado es el PYG, (Magnet et al, 2014; Mirjali et al, 2013). Otro medio utilizado es el YAS, (Alves et al, 2012), también se ha utilizado el TYI-S-33, (Rahdar et al, 2012), el Líquido de Cerva, (Lares et al, 2001), el PBSGM (modificado) y Bactocasitona (BC) al 2%, con 10% de suero fetal bovino, (Ortiz et al, 2012).

### **1.2.4 Temperaturas de incubación de los cultivos.**

Otro aspecto para analizar, es la temperatura de incubación de las muestras en cultivo que va desde temperaturas de 23°C, (Booton et al., 2004), 25°C, (Jeong

et al., 2005), 28°C, (Magnet et al., 2013), 30°C, (Maschio et al., 2015), 32°C, Muchesa et al., 2014), 37°C, (Wannasan et al., 2013), 28°C y 42°C, (Fluviá et al 1983), 40°C, (Al-Herrawy et al., 2014), estas últimas temperaturas fueron utilizadas desde el inicio con el fin de aislar *Acanthamoeba* spp. termotolerantes.

### **1.2.5 Tiempo de incubación de los cultivos**

El tiempo de incubación de las placas de cultivo también varía según los diferentes investigadores: 3 días, (Adamska et al., 2014), 4 días, (Garaycochea et al., 2008), 7 días, (Kiss et al., 2014), 10 días, (Bagheri et al., 2010), 2 semanas, (Kao et al., 2012), 20 días, (Salazar et al, 1982), 1 mes (Jeong et al, 2007), más de 1 mes. (Ghadar-ghdr et al., 2012).

### **1.2.6 Termotolerancia**

Para el caso de la termotolerancia, una gran parte de los investigadores utilizan temperaturas entre 30°C a 37°C. Algunos de los rangos utilizados han sido los siguientes: 30°C y 37°C, (Alves et al., 2012), 30°C y 42°C, (Niyiyati et al., 2014), 32°C y 37°C, (Muchesa et al., 2014); 33°C, 37°C y 42°C, (Magnet et al., 2014), 37°C, 42°C y 52°C, (Çoşkun et al, 2013), 45°C y 47°C, (Leiva et al., 2008), 37°C, 42°C y 45°C, (Ortiz et al, 2012).

### **1.2.7 Sensibilidad de las técnicas**

Es conocido que las técnicas moleculares son más sensibles que las técnicas de diagnóstico morfológico, que la PCR Tiempo Real es más sensible que la PCR tradicional y que la PCR tradicional es más sensible que el cultivo. Otro aspecto es la posibilidad de obtener cultivos falsos negativos. En un estudio realizado en una Planta de tratamiento de aguas residuales en Sud África, además de confirmar molecularmente las 22 muestras positivas del estudio, eligieron al azar 8 muestras negativas al cultivo, el resultado fue que una de las muestras diagnosticadas negativas resultó positiva, (Muchesa et al, 2014). En una publicación relacionada con análisis de agua en planta de tratamiento obtuvieron un 94,5% por PCR-Tiempo Real y 85,2% por cultivo, (Magnet et al, 2013). Una experiencia diferente tuvieron investigadores, los que en su estudio encontraron

que por PCR diagnosticaron un 9,6% y por cultivo 15,4%. En muestras de agua superficial en Gdynia, Sopot y Gdansk, Polonia, diagnosticaron 13 muestras positivas por PCR Tiempo Real, sin embargo, sólo 10 fueron diagnosticadas por PCR tradicional, (Lass et al, 2014). En otro estudio, tuvieron una doble experiencia en relación a sensibilidad de las técnicas, en agua de planta de tratamiento, en invierno encontraron 15 muestras positivas por cultivo (93,8%) y 16 (100%) por PCR-Tiempo Real y en primavera 89,3% por cultivo y por PCR-Tiempo Real un 83,9%, (Magnet et al, 2012). El problema que presentan las técnicas de PCR es que son capaces de detectar la presencia de DNA y no son capaces de discernir entre microorganismos viables y no viables.

## **2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE MUESTRAS DE AGUA.**

**2.1 *Acanthamoeba* spp. en agua:** la media de aislamientos positivos encontrada fue del 17% (63/362), correspondiendo el 15% (10/65) a la zona norte, el 19% (43/222) a la zona centro y el 13% (10/75) a la zona sur. En las 63 muestras positivas el 44% (28/63) fueron cultivos mixtos. El hecho de analizar sólo 200 ml de muestra de agua pudo haber influido en el porcentaje del hallazgo de *Acanthamoeba* spp, también pudo haber influido el número de días de incubación, que fueron 10 días, lo que se pudo comprobar, en la muestra de agua que dio positiva a los 13 días y que por olvido no se había eliminado el día 10. No obstante, considerando que en su hábitat natural, las amebas de vida libre se encontrarán en su mayoría formando parte de biofilms, aquellas que se detectan en aguas superficiales serán las que se han separado del biofilm y viajan libres por las aguas. Si se tomasen grandes cantidades de agua para el muestreo, por ejemplo los 100 litros que la EPA recomienda para la detección de otros protozoos, el aislamiento de amebas de vida libre resultaría casi sin duda positivo. Tomar menores cantidades de agua en las muestras, del orden de 100 ml y 200 ml, hace que la detección en ellas de amebas de vida libre potencialmente patógenas permita definir el riesgo que suponen estas aguas cuando son utilizadas con fines recreativos (Garcia et al, 2013)

Porcentajes menores a este trabajo fueron encontrados en un trabajo realizado en aguas de ríos, lagos y mar en Taiwán con un 14,2%, (Kao et al, 2013). En el análisis de 200 ml de agua, la misma cantidad de agua que en este trabajo, estos autores encontraron un 6,5% de muestras positivas, (Adamska et al., 2014). En aislamiento en áreas extremas, además de la Antártica, también se ha investigado en muestras de 4 áreas de agua congelada en Oslo, Noruega, identificando en 2 áreas *Acanthamoeba castellanii*, (Brown et al, 1977). Porcentajes mayores fueron obtenidos en las siguientes investigaciones: en Ica, Perú, en aguas de pozo, tanques de hidroterapia, embalses, obtuvieron un 21%, (Suárez et al, 2002). En un estudio en el norte de Taiwán, 21,6%, en muestras de agua de manantial, (Huang S-W et al, 2010). En un estudio realizado en Nicaragua, en 294 muestras (ríos, muelles, pozos, grifo y tanques de agua) con un 31,2%, aunque ellos analizaron 540 ml de agua por muestra, (Leiva et al., 2008). En la Región de Shiraz de Irán, en 120 agua de pozos, tanques y red de abastecimiento obtuvieron un 33% de positividad, (Ghadar-ghadr Sh, 2012). En Italia, encontraron un 39,1% a *Acanthamoeba* spp., (Montalbano et al, 2015). En Chile, en un estudio realizado sólo con diagnóstico morfológico en muestras de canales de regadío, embalses, ríos, vertientes, piletas, pozos, encontraron 31,5% de positividad de *Acanthamoeba* spp., (Muñoz et al, 1993). En otra investigación realizada en Irán, obtuvieron un 71,6% de positividad en muestras de agua de canales agrícolas, ríos, agua de grifo, cuencas fluviales, piscinas de natación y piscinas de parques, (Rahdar et al, 2012). En otro estudio realizado en Pakistán, encontraron un 92% de contaminación por *Acanthamoeba* spp., (Tanveer et al, 2013). En 16 muestras de agua, en Brasil obtuvieron un 100% de positividad, (Alves et al, 2012). Todo esto lo que indica son unos resultados muy variables, que serán debidos tanto al nicho ecológico en que se realiza el estudio, además de la variabilidad en la metodología. En cualquier caso, cuanto menor sea el volumen de muestra tomado mayor es el riesgo que supone para la salud la presencia de *Acanthamoeba*.

## 2.2 Tipo de muestras de agua

Los tipos de muestras que resultaron positivas fueron las siguientes: agua potable clorada (piscinas), agua potable rural (APR), agua de canal de regadío, agua de mar, agua de lago-laguna, agua de terma, agua de río, agua de pozo, agua de noria, agua de embalse.

**2.2.1 Agua Potable:** en este estudio se analizaron 72 muestras las que resultaron todas negativas, sin embargo, en 4 de ellas se observaron AVL pertenecientes a otros géneros, entre los cuales, podrían estar involucrados amebas endosimbióticas que eventualmente podrían transmitir algún microorganismo patógeno. Otros autores también obtuvieron resultados negativos en el análisis de sólo 4 muestras, (Rezaeian et al., 2008), pero totalmente distinta es la situación en otros estudios como el realizado en Hong Kong en el análisis de muestras de agua potable de tanques de agua y lavabo del baño de hogares, encontrando un 10% de positividad, (Boost M et al., 2008). En un estudio realizado en Nicaragua, 74 muestras dieron 19% de positividad y con sólo 50 ml de muestra, (Leiva et al., 2008). En Egipto 58,6%, (Al-Herrawy et al, 2013), otros autores encontraron un 5,8% en 207 muestras de agua del grifo domiciliario, (Jeong et al., 2005). En Jamaica se encontró un 36,1% de muestras positivas, (Lorenzo-Morales et al., 2005). En 94 muestras de agua de diferentes salas de hospitales de 13 ciudades de Irán, encontraron un 48% de positividad, (Bagheri, et al, 2010). En la Isla Kish, al sur de Irán, estudiaron 55 muestras de agua potable de tanques de almacenamiento de casas, mall o resort, encontrando 38,2% de AVL, de las cuales *Acanthamoeba* spp. fueron 66,7%, (Niyiyati et al, 2015). En Sudán, en agua de fuentes ambientales y de consumo encontraron un 58% de *Acanthamoeba*, correspondiente a *A. castellanii*, (Shanan S et al., 2015). En 150 muestras de agua del grifo de la Provincia de Sivas, Turquía, encontraron 9 *Acanthamoeba*, 8 *A. castellanii* y 1 *A. polyphaga*., (Coşkun et al, 2013). En Tailandia encontraron en agua un 36,7% y en Hamamatsu, Japón 22,5%, (Nacapunchai et al, 2001). En Madrid, en un estudio en 43 aguas de consumo domiciliarias, encontraron 14% de muestras positivas en el sistema de agua central, (Madrigal-Sesma et al, 1986). Sin duda, el índice de positividad de las

aguas de red debe de estar relacionado, por una parte con la concentración de estas amebas en las aguas naturales de las que se abastecen las poblaciones, pero también de la resistencia de estas amebas a los procesos de potabilización, y a las posibilidades que las conducciones ofrecen para actuar como reservorio de estas. Así pues, los materiales de dichas conducciones juegan un papel importante en la preservación de las poblaciones, (Fernández MT, Tesis 2014. Universidad de Zaragoza).

Por ello, y dado que el resultado negativo en las 72 muestras es muy llamativo, sobre todo cuando se compara con los datos de diferentes estudios mencionados anteriormente, sería interesante analizar mayor cantidad de muestra y realizar estudios en agua de plantas de tratamiento en las diferentes etapas del procesamiento lo que podría ayudar a confirmar o no los resultados obtenidos. Actualmente, el Decreto 735 relacionado con el Reglamento de los Servicios de aguas destinadas al consumo humano está en revisión, y para ello, se organizó una Jornada Nacional de Vigilancia Sanitaria de Agua Potable, el objetivo fue que diferentes especialistas entregaran una propuesta de modificación al Reglamento. Por primera vez fueron considerados los parásitos en el programa de la Jornada, sin embargo, los asistentes no encontraron importante analizar su incorporación en el Reglamento porque no se han denunciados brotes, los ocurridos en el último tiempo han sido de índole bacteriológicos y eventos químicos.

**2.2.2 Agua Potable rural (APR):** son servicios que se prestan en áreas rurales o agrícolas, autorizados por los Servicios de Salud del Ambiente, dependientes del MINSAL, quienes son los encargados de realizar vigilancia, mediante programas de inspecciones, en los cuales estas aguas son sometidas a análisis bacteriológico y químico. En este trabajo se obtuvo un 50%, con 1 muestra positiva de la zona norte, en un estudio en agua rural realizado en la Provincia de Markazi, Irán, obtuvieron un 61% de positividad, (Mosayebi et al, 2013). Probablemente, los procesos de potabilización a los que es sometido el agua en estas zonas son menos exigentes que en las poblaciones urbanas. También las características de las conducciones pueden ser muy diferentes, en materiales y en antigüedad.

**2.2.3 Agua mineral embotellada:** en este estudio, 20 muestras de agua mineral embotelladas con y sin gas (13-7 respectivamente), no se aisló *Acanthamoeba* spp., sin embargo, en una muestra de agua mineral con gas se encontró un ácaro en el cultivo incubado a 25°C. y una AVL perteneciente a otro género, cuya identificación molecular es importante porque podría pertenecer a algún género en los que se ha descrito endosimbiosis con algún agente microbiano patógeno, lo que podría ser un riesgo en individuos con algún tipo de inmunocompromiso. Muy diferentes fueron los resultados obtenidos en 14 aguas minerales en Porto Alegre, Brasil, donde encontraron 8 muestras positivas. En el análisis de las secuencias, se identificaron 6 pertenecientes al genotipo T5, 1 genotipo T11 y 1 genotipo T4, (Maschio et al., 2015), en otro estudio, también realizado en Brasil, detectaron un 60% con *Acanthamoeba* spp., (Salazar et al., 1982) En 14 marcas de aguas minerales, aislaron *Acanthamoeba triangularis*, los autores mencionan que dos marcas de agua mineral están especialmente aconsejadas para la preparación de biberones., (Fluviá et al, 1983). En análisis de agua mineral en Italia, encontraron 15,8%, (Montalbano et al, 2015). La diferencia de cantidad de muestra de agua podría ser una explicación a estos resultados, debido a que en dos de estos estudios analizaron 10 litros por muestra. Además influye también la procedencia del agua embotellada, ya que el agua de manantial no está exenta de amebas. Otro procedimiento es la depuración de agua de red ya potabilizada, aunque en este caso se supone que se parte de agua inicialmente negativa. Por otra parte, y como ya se ha comentado son organismos ubicuos, y no se ha demostrado que la ingesta de agua con *Acanthamoeba* cause problemas, sino que en estudios en que se han buscado en heces humanas, no se ha obtenido más de un 2% de positivos. Los estudios de inmunidad han demostrado que una gran parte de la población posea anticuerpos anti\_*Acanthamoeba* debido al constante contacto con ellas.

**2.2.4 Muestras de agua de mar:** en 58 muestras de agua de mar en las que se obtuvo un 19%, correspondieron a 2/16 (13%) del norte, 4/24 (17%) del centro y 5/18 (28%) del sur. Mayores porcentajes fueron encontrados en un estudio en Jamaica con un 49,6%, (Lorenzo-Morales et al., 2005). Totalmente contrario

fueron los resultados obtenidos en un estudio en 30 muestras de agua de mar realizado en playas al sur de Florida, Estados Unidos, las cuales fueron todas negativas, (Booton et al, 2004). Los hallazgos dependen de las características de la zona, de la temperatura, la salinidad, el ph que pueden hacer variar los resultados.

**2.2.5 Muestras de agua de canal de riego:** se obtuvo un 31% (11) de positividad, las muestras positivas estuvieron distribuidas en las zonas norte y centro. Porcentaje inferior obtuvieron en Irán, en 12 muestras de agua de canales agrícolas con un 16,7%, (Rahdar et al, 2012).

**2.2.6 Muestras de agua de pozo sin clorar:** se obtuvo un 31% (4/13), todas las muestras son de la zona central. Porcentaje muy inferior, de un 2,4%, obtuvieron en el Estado de Hidalgo, México analizando agua de 6 pozos, (Ramírez et al, 2012), en León, Nicaragua, en 111 muestras de pozo encontraron una positividad de 21%, (Leiva et al, 2008). Lo mismo ocurrió en un estudio realizado en la parte occidental de Guinea-Bissau, en pozos de áreas rurales con un 18%, (Baquero et al, 2014). Un porcentaje mayor correspondiente a un 44,4%, obtuvieron en Irán, (Ghadar-ghadr et al, 2012).

**2.2.7 Agua de río:** se obtuvo un porcentaje de 9%, correspondiendo a 1 muestra de centro y 2 muestras del sur, todas genotipos T4, las temperaturas del agua de los ríos eran similares, la temperatura del agua del río del centro estuvo entre 4°C y 26°C y la temperatura de uno de los ríos del sur estuvo en un rango entre 6°C a 28°C. Porcentaje menor obtuvieron en un estudio entre los años 2009 al 2012, en Polonia, con un 2,5% de positividad, (Adamska et al, 2014). Otros estudios con resultados de positividad mayores son: en León, Nicaragua, en 88 muestras de río quienes encontraron una positividad de 13%, (Leiva B., et al, 2008), en muestras del río Puzih, al sur de Taiwán diagnosticaron 13,5% *Acanthamoeba* spp., (Po Min Kao, 2012). En Taiwán, en 211 muestras encontraron 16,1%, En 55 muestras de agua del río Kaoping, identificaron *Acanthamoeba* spp. en 23,6%. En un estudio en Jamaica, encontraron un 26,4%, (Lorenzo-Morales et al, 2005). En un estudio en Irán, obtuvieron un 25% de positivas. En Egipto, en el río Nilo,

encontraron 56% de positividad, (Al-Herrawy et al, 2013). En Alemania, en agua de río encontraron 79% de contaminación por *Acanthamoeba*, (Hoffmann et al, 2001). Totalmente distintos fueron los resultados obtenidos en el análisis de 3 muestras de río en Córdoba, Argentina, las que resultaron todas negativas, (Laconte et al, 2013). En los ríos influye mucho la zona en que se toma la muestra, y también la profundidad.

**2.2.8 Agua de Laguna-Lago:** se obtuvo un 19%, correspondiente a muestras de la zona sur. Porcentaje inferior obtuvieron en Polonia, en un estudio realizado entre los años 2009 al 2012, en el que aislaron *Acanthamoeba* spp. en un 4% (Adamska et al, 2014) y porcentaje superior obtuvieron en un estudio realizado en agua de lagunas en Ica, Perú, con un 85,7% (Suárez et al, 2002).

**2.2.9 Agua de embalse:** se obtuvo un porcentaje de 20%, en una muestra del norte correspondiente a genotipo T3. Muy diferente a lo obtenido en un estudio realizado en Taiwán, con un 58%, (Tzeng et al, 2013), en Alemania, encontraron 56% de *Acanthamoeba* termofílicas, (Hoffmann et al, 2001). En Chile, el primer aislamiento de *Acanthamoeba palestinensis* se realizó en 1981 en una muestra de agua de embalse de la zona central, (Herskovic et al, 1989). En los resultados puede influir el lugar y profundidad donde se tomó la muestra y el estado de eutrofización del embalse.

**2.2.10 Agua de Terma:** en este trabajo se obtuvo un 17%, la muestra positiva pertenece a la zona norte. Porcentaje similar obtuvieron en Taiwán, realizado en la cordillera Central, con 16,4%, se identificó *Acanthamoeba griffini* y *Acanthamoeba jacobsi*, (Hsu et al, 2009). Porcentaje inferior obtuvieron en la Provincia de Ardebil, Irán, con 3,6%, la ameba fue identificada como *Acanthamoeba castellanii*, (Badirzadeh et al, 2011). En Taiwán, obtuvieron un 10,4%, (Kao et al, 2013). Mayores porcentajes obtuvieron en otros estudios como el realizado en el norte de Taiwán donde *Acanthamoeba* spp. fue detectada en un 21,2%, (Huang et al, 2010). En un estudio realizado en Italia, identificaron *Acanthamoeba* spp en 33,3% en aguas termales, (Montalbano et al, 2015). En Hidalgo, México, encontraron un 43%, (Rivera et al, 1989). Las temperaturas en

las aguas termales son altas por lo cual es posible aislar AVL patógenas termoresistentes, tanto de especies de *Acanthamoeba* spp. como de otras amebas, como *Naegleria* spp.

**2.2.11.a Agua de piscina:** las 78 muestras de agua clorada, que corresponde al agua de piscinas, en este trabajo se obtuvo un 35%, las muestras pertenecían a la zona centro, específicamente a la Región Metropolitana. Porcentaje cercano obtuvieron en un estudio realizado en la ciudad de Terán, Irán, con 33,3%, (Rezaeian et al., 2008). Porcentaje parecido tuvieron en investigación realizada en Egipto 49,2% en agua de piscinas del Cairo, (Al-Herrawy, 2013). En estudio realizado en Suiza, en piscinas públicas temperadas identificaron *Acanthamoeba lenticulata.*, (Gianinazzi et al, 2009). En San Luis de Potosí, México, obtuvieron un 53% en aguas recreacionales, (Ortiz et al, 2012). En Hermosillo, Sonora, México, encontraron 56%, (Lares et al, 2001), En investigación realizada en agua de piscinas en Szczcin, Polonia, obtuvieron 59.7%, (Górnik et al, 2004). Otros investigadores lograron un 100% de positividad, como es el caso del estudio realizado en Kuala Lumpur, en Malasia, (Init et al, 2010) y también en el estudio realizado en Brasilia, en el que evaluaron 7 piscinas, con 100% de positividad, (Alves et al, 2012). Porcentajes menores en otras investigaciones como el realizado en el sur de Brasil, también identificaron un 20% de *Acanthamoeba*, (Caumo et al, 2011).

#### **2.2.11.b Piscinas que cumplen o no el reglamento.**

Las piscinas deben cumplir los parámetros exigidos por el Decreto N° 209, del Ministerio de Salud que son: el pH debe estar en el rango entre 7,2 a 8,2, el cloro libre residual 0,5 a 1,5 ppm, bacterias aeróbicas  $\leq 200$  colonias/ml, ausencia de coliformes fecales, coliformes totales  $\leq 20$  colonias/100, entre otros parámetros. Las piscinas inspeccionadas que cumplían el reglamento y el análisis dio positivo a *Acanthamoeba* spp. fueron 34% (10) y las que no cumplían y que el análisis dio positivo fue 58% (15), fueron significativas las diferencias en las proporciones de positividad ( $\chi^2 = 15,1$ ; p-valor=0,0005). Diferentes resultados se obtuvieron en un estudio realizado en agua de piscina en Hungría, en el que evaluaron 107

piscinas desinfectadas y 57 no desinfectadas, los resultados obtenidos fueron que *Acanthamoeba* se encontró en 6,5% en piscinas desinfectadas y 7% en piscinas no desinfectadas, fueron porcentajes muy cercanos, los autores concluyen que los métodos de desinfección son inadecuados, (Kiss et al, 2014).

En Chile, no existe normativa que involucre los parásitos en los programas de vigilancia del agua. En el Decreto 209, de 2002, modificado por Decreto 43/06, del Ministerio de Salud que “Aprueba reglamento de piscinas de uso público”, la inspección se refiere a los parámetros físico-químicos y microbiológicos, sin embargo, no menciona específicamente los parásitos. En el artículo 11 del título III, que se refiere a la calidad del agua, especifica “ausencia de algas, larvas u otro organismo vivo”, si no existe normativa que involucre vigilancia en relación a este parámetro no es posible evaluarlo. Además, en este estudio se analizó sólo 200 ml de muestra, teóricamente si analizáramos 1000 ml podrían aumentar los porcentajes. En relación a *Acanthamoeba* spp., los resultados de este estudio confirman lo encontrado por varios investigadores sobre la existencia de este protozoo en diversos tipos de muestra y condiciones y la necesidad de evaluar la posibilidad de incorporarlos en las normativas actuales, como ocurre en algunos países industrializados y en vías de desarrollo, como por ejemplo la NOM-245-SSA1-2010, Norma Oficial Mexicana.

**2.3 Estacionalidad:** En las muestras de agua tomadas en otoño se obtuvo un 11%, en primavera con un 18%, invierno con un 11% y verano con un 27% , se observó un mayor porcentaje con las muestras tomadas en el verano, resultando significativas las diferencias halladas con la primavera, otoño e invierno ( $\chi^2=12,41$ ; p-valor= 0,0061). En las muestras de agua, las temperaturas atmosféricas promedio en otoño fue de 11,8°C como mínima y 22,4°C como máxima, en el invierno mínima de 7,1°C y máxima 14,6°C, en primavera, mínima de 9,5°C y máxima de 25,4°C, en el verano, mínima de 12,4°C y máxima 29,4%. En estudios estacionales otros investigadores encontraron variados resultados: en España en estudio en agua de plantas de tratamiento de agua potable y residuales, observaron que el mayor porcentaje de *Acanthamoeba* estaba en Primavera, seguido por el verano, luego el otoño y finalmente el invierno, (Magnet

et al, 2013). En otro estudio estacional efectuado en aguas de Oklahoma, encontraron que *Acanthamoeba* tendió a ser aislada en primavera y verano, (John et al, 1995). En aguas del Lago Willard, Estados Unidos, encontraron que *Acanthamoeba* predominaba entre verano y otoño, (Kyle et al, 1986). En un estudio realizado en Taiwán, el mayor porcentaje de positividad lo encontraron en otoño, con un 28,3% en invierno 21,7% y en primavera 8,3%, (Tzeng K et al, 2013). En un estudio realizado en Sud África, también obtuvieron el mayor porcentaje en otoño con un 51,2%, en verano 2,3%, invierno y primavera fueron negativos, (Muchesa et al, 2014). En análisis en dos estaciones de planta de tratamiento de agua encontraron en invierno obtuvieron 100% y en primavera 89,3%, (Magnet et al, 2012). En un estudio en 7 piscinas cubiertas en Bahía Blanca, Bs Aires, encontraron que en primavera e invierno tuvieron más positivos que en verano y otoño, los autores explican que los mayores positivos en invierno y primavera coinciden con mayor cantidad de bañistas, (Gertiser et al, 2010). Otros estudios no muestran diferencia estacional, como es el caso de análisis de aguas residuales tratadas en industria textil en México, (Ramírez E., et al, 2014), la misma situación observaron en Alemania, en muestras de agua de tres Plantas de Tratamiento, en un período de 3 años, durante los cuales *Acanthamoeba* spp. no mostró estacionalidad, (Hoffmann et al, 2001). De Jonckheere en 1981 plantea que el mayor porcentaje de aislamientos de *Acanthamoeba* ocurre más en primavera que en otoño, que las condiciones climáticas más favorables para la infectividad de los parásitos son los meses más calurosos.

**2.4 Termotolerancia:** el crecimiento a 42°C es considerado como un factor de virulencia indirecto de *Acanthamoeba*, que muestra una mayor patogenicidad de estas amebas, en este estudio todas las muestras fueron positivas a 42°C. En un estudio en Egipto, con el fin de detectar *Acanthamoeba* termotolerante a 40°C, se obtuvieron los siguientes resultados, 56% de agua del Nilo, 58,6% de agua del grifo y 49,2% de agua de piscina, (Al-Herrawy et al, 2013). En otro estudio, realizado en Tailandia, a 42°C hubo crecimiento de *Acanthamoeba* spp. en el 42,8% de las muestras estudiadas, (Wannasan et al, 2013) . En muestras de agua de río y lago, en Polonia, el 10% crecieron a 42°C, los cultivos se incubaron

72 horas a 37°C y luego a 42°C, (Adamska et al, 2014). En Sonora, México se investigaron AVL en muestras de aguas superficiales, se incubaron a 20°C, 37°C y 45°C, a 45°C sólo se desarrolló 1 *Acanthamoeba* spp., en los aislamientos a 37°C se aislaron 18 *Acanthamoeba* spp, en los aislamientos a 20°C se encontraron 3 *Acanthamoeba* spp, (Lares-Jiménez et al, 2009). En un estudio en piscinas en Hungría, encontraron 9 *Acanthamoeba* y se estudió su termotolerancia a 25°C, 30°C, 36°C y 42°C, las *Acanthamoeba* no crecieron a 42°C, (Kiss et al, 2014). Estudio realizado en la Provincia de Ardebil, Irán, 20% temperaturas de 30°C, 37°C y 42°C por 30 días, todas crecieron a 30°C, 92% crecieron a 37°C y 67% crecieron a 42°C, (Solgi et al, 2012), en un estudio realizado en Nicaragua, los cultivos se incubaron a 40°C, 42°C, 45°C y 47°C por 5 a 7 días, a 40°C crecieron 34 *Acanthamoeba* spp., a 42°C crecieron 5 y a 45°C ninguna, (Leiva et al, 2008).

**2.5 Termotolerancia a 60°C:** El estudio de la termotolerancia realizada a las 170 muestras positivas, con cultivos incubados a 60°C, fueron todas negativas al cultivarlas nuevamente a 25°C y 37°C. A continuación se mencionan algunos estudios de termotolerancia a temperaturas mayores de 50°C. Un estudio realizado con incubación de cultivos a altas temperaturas se realizó en Turquía en muestras de agua, las incubaciones se realizaron a 37°C, 42°C y 52°C por 2 días. Fueron 50 las cepas de AVL que crecieron a 37°C, 12 a 42°C y 3 *Acanthamoeba* spp. crecieron a 52°C, (Özçelik S. et al, 2012). En otro estudio en agua, realizado también en Turquía, en la Provincia de Sivas, lograron el crecimiento de 6 *Acanthamoeba* spp. a 52°C, (Coşkun et al, 2013). En Barcelona se evaluó el tiempo necesario para lograr la reducción de 3 log en viabilidad después de ser expuestos a temperaturas de 50°C, 60°C y 70°C. Los trofozoítos de *A. castellanii* CCAP 1534/2 lograron la reducción de 3 log en temperatura de 50°C a los 24,23 minutos, a 60°C a los 4 minutos y a 70°C menos de 0,5 minutos. Los quistes de *A. castellanii* CCAP 1534/2 lograron la reducción de 3 log en temperatura de 50°C a los 227,49 minutos, a 60°C a los 32,14 y a 70°C a 0,71 minutos, (Cervero-Aragó et al, 2013).

**2.6 Clasificación de Pussard y Pons:** en las muestras de aguas la medición mínima fue de 9,44µm, la medición máxima de 25,5µm. En el grupo II se incluyeron el 97% de los quistes de *Acanthamoeba* spp. y en el grupo III un 3%, experiencias de varios investigadores fueron: en un estudio en Malasia evaluaron los quistes de 23 aislados de piscinas, los que midieron entre 8 a 20µm, la mayoría midieron menos de 18µm, presentando características de los grupos II y III de Pussard, (Init et al, 2010). En estudio realizado en Brasilia, se midieron 100 quistes en muestras de 7 piscinas, los diámetros estuvieron en un rango entre 10,6 a 16,4µm, 3 aislados quedaron clasificados en el grupo II y 4 en el grupo III, (Alves et al, 2012). En piscinas de Bahía Blanca, Buenos Aires, se midieron 30 quistes que presentaron tamaños entre 6.3µm y 13,4µm, 8 *Acanthamoeba* spp. quedaron incluidos en el grupo II y 4 en el grupo III, (Gertiser et al, 2010). Otros autores sólo encontraron *Acanthamoeba* spp. pertenecientes al grupo II, como es el caso del análisis de aguas residuales tratadas en industria textil en México, (Ramírez E. et al, 2014). En otro estudio se midieron quistes de 22 aislados, fueron incluidos en el grupo II con mediciones entre 12,2 a 18,2 µm de diámetro, (Jeong et al, 2007). Otros investigadores, en el estudio en plantas de tratamiento de aguas residuales, identificaron 5 *Acanthamoeba* spp., las que fueron clasificadas en los grupos I y II de Pussard, (García et al, 2011).

La mayoría de los casos de queratitis por *Acanthamoeba* son causados por representantes del Grupo II de Pussard, aunque cepas del grupo III también han sido publicados como agente causal de Queratitis por *Acanthamoeba*. Sin embargo, en algunos casos, la identificación morfológica es ambigua y la confirmación de algunas especies descritas ha sido cuestionada, (Lorenzo-Morales, 2005). En el 2013 se identificó el genotipo T18, llamada *Acanthamoeba byersi* n. sp., clasificada en el Grupo I, cuyos quistes midieron entre 20 a 35µm, siendo el primer genotipo productor de patología en el ser humano, incluido en el Grupo I (Qvarnstrom et al, 2013). La clasificación de Pussard ha comenzado a ser poco fiable debido a sutiles diferencias en características de los quistes y que ha ido cambiando con el desarrollo de métodos moleculares específicos y sensibles. (Lass et al, 2014).

Entre los aspectos que pueden aumentar el riesgo de contaminación del agua por *Acanthamoeba* spp., están los biofilms que son microorganismos que viven en comunidades asociadas a las superficies, este modo de organización se asocia a todas las superficies en contacto con agua potable en el procesamiento del agua, almacenamiento y distribución. Las amebas son capaces de colonizar los sistemas de distribución del agua en el área probablemente por la formación de biofilms, debido a que pueden persistir dentro de ellos, actuar como un reservorio blindado ambientalmente y ser vectores para patógenos, especialmente cuando están enquistadas. Los biofilms asociados con agua potable albergan bacterias patógenas ubicuas, patógenos oportunistas, protozoos parásitos, virus, toxinas liberadas por hongos y algas. Estos protozoos pueden servir como vehículos para la multiplicación y dispersión de bacterias. Los biofilms proveen atractivos nichos para *Acanthamoeba* por sus requerimientos nutricionales, además de proveer resistencia a desinfectantes. La presencia de biofilms dentro del sistema de distribución, aumenta su resistencia de los microorganismos a los desinfectantes tales como cloro y dióxido de cloro. Su presencia representa una doble amenaza para la salud humana, por servir como reservorios de bacterias patógenas tales como *Legionella* spp y *Mycobacterium* spp, entre otras, que proliferan en el protozoo aumentando así la probabilidad de causar enfermedad en humanos. Además, las amebas por si solas son patógenos oportunistas en humanos y las personas con problemas en su sistema inmune son especialmente vulnerables. Los biofilms juegan un importante rol en la queratitis por *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto y la prevención de la formación de biofilm es quizás una importante estrategia preventiva, (Marciano-Cabral et al, 2010; Farkas et al, 2012; Lorenzo-Morales, 2015; Retana-Moreira et al, 2015).

### **3. Análisis molecular de *Acanthamoeba* spp. en agua.**

#### **3.1 Genotipos de *Acanthamoeba* spp. en agua.**

**3.1.1 Confirmación de diagnóstico morfológico por PCR:** en este trabajo los genotipos identificados en las 63 muestras de agua fueron: el 3% (2) genotipos

T2, el 5% (3) genotipo T3, el 86% (54) genotipo T4, el 6% (4) genotipo T11. En un estudio realizado en Brasil, los genotipos T4 y T5 fueron encontrados en muestras de agua, mientras que sólo hubo coincidencia con el genotipo T4, Alves et al, 2012). En una investigación realizada en Italia, identificaron 33 genotipos T4 y 10 genotipos T15, (Montalbano et al, 2015). En Alejandría, Egipto, los genotipos identificados fueron el T1, el T2, el T3, el T4 y el T7, coincidiendo con este trabajo en los genotipos T2, T4 y T3, (Lorenzo-Morales et al, 2006). En Polonia, en muestras de agua de ríos y lagos todas las *Acanthamoeba* spp. pertenecieron al genotipo T4, (Lass et al, 2014). En Polonia, el análisis de muestras de agua de ríos, lago y mar, los genotipos identificados fueron el T4 y el T16, (Adamska et al., 2014). Se tomaron muestras de agua recreacional en Tehran, Irán, encontrando 14 muestras positivas identificadas como genotipo T4 y 2 como genotipo T5. Este último genotipo, los autores indican que es el 2° en frecuencia en muestras ambientales, (Nazar et al, 2011). En este trabajo no se encontró el genotipo T5 en muestras de agua. El genotipo T4 es el más comúnmente encontrado en muestras ambientales y también en clínicas procedentes de queratitis en más del 90%, (Khan NA, 2006).

**3.1.2 Genotipo en Agua Potable Rural (APR):** la única muestra positiva fue identificada como genotipo T4. En el estudio realizado en Irán descrito anteriormente, sólo presentaron resultados de análisis fenotípico.

**3.1.3 Genotipos en muestras de mar:** en este estudio se identificaron los siguientes genotipos: 9% (1) genotipo T2, 64% (7) genotipos T4 y 27% (3) genotipos T11. En el estudio realizado en Jamaica los autores encontraron 2 muestras pertenecientes al genotipo T1, 3 al genotipo T2, 6 al genotipo T4, y 2 al genotipo T11. Hubo coincidencia de los genotipos T2, T4 y T11 con los encontrados en este trabajo y también el genotipo T4 es el mayoritario en este tipo de muestras. (Lorenzo-Morales et al., 2005)

**3.1.4 Genotipos agua de canal de regadío:** en este estudio, se encontraron muestras pertenecientes al genotipo T3 en un 9% (1) y al genotipo T4 en un 91%

(10). En Irán, en las 12 muestras de agua de canales agrícolas con un 16,7%, identificaron los genotipos T2 y T4, (Rahdar et al, 2012).

**3.1.5 Genotipos de agua de pozo sin clorar:** en esta investigación se identificó el genotipo T4 en un 100% (4). En un estudio realizado en Guinea-Bissau, fueron identificadas 1 muestra genotipo T3 y 3 pertenecientes al genotipo T4 (Baquero et al, 2014).

**3.1.6 Genotipos en agua de río:** en este estudio, las muestras positivas fueron identificadas como pertenecientes al genotipo T4 en un 100% (3). Similares resultados obtuvieron en el análisis de las muestras de agua del río Puzih, al sur de Taiwán, donde identificaron *Acanthamoeba* genotipo T4, (Kao, 2012). El mismo genotipo T4 encontraron los autores de un estudio en Irán, (Rahdar et al, 2012) En muestras de agua del río Kaoping, identificaron *Acanthamoeba* genotipo T15. En muestras de agua de río en Jamaica, identificaron 11 genotipos, 6 genotipos T2, sólo 1 hallazgo de amebas de los siguientes genotipos: T4, T5, T7, T9 y T11, (Lorenzo-Morales et al, 2005). Entre los años 2009 al 2012, en Polonia, se identificaron 5 *Acanthamoeba* genotipo T16 procedentes de agua de río, (Adamska et al, 2014).

**3.1.7 Genotipos en agua de laguna-lago:** en las muestras de este trabajo, se obtuvo un 67% de amebas perteneciente al genotipo T4 y un 33% al genotipo T11, ambos genotipo han sido agente causal de pacientes con queratitis y el genotipo T4 se ha aislado en pacientes con EGA, por lo cual estas aguas presentan un posible factor de riesgo a la salud de la población. En un estudio en Polonia, se encontraron 4 genotipos T4 y 4 genotipos T16, en este mismo tipo de muestras. (Adamska et al, 2014).

**3.1.8 Genotipo en agua de embalse:** en este estudio, la muestra positiva correspondió a genotipo T3, el cual ha sido identificado en casos de queratitis. En un estudio realizado en Taiwán, además de identificar el genotipo T3, encontraron los genotipos T4, T10 y T11, (Tzeng et al, 2013).

**3.1.9 Genotipos en agua de termas:** en este trabajo, la única muestra positiva se identificó como genotipo T4, aislado en casos de queratitis y EGA, constituyendo un posible riesgo en personas visitantes de estos centros recreacionales y sobretodo personas con sistema debilitado. El mismo genotipo encontraron en un estudio realizado en Italia, (Montalbano et al, 2015), identificando 2 genotipos T4. En un estudio en el norte de Taiwán, identificaron los siguientes genotipos: T15, T6, T5, genotipos T1, T2, T3 y T4 con 1 hallazgo, (Huang et al, 2010). En 28 muestras de agua de termas en Ardebil, Irán, aislaron 1 *Acanthamoeba castellanii* y correspondió a genotipo T4, (Badirzadeh et al, 2011).

**3.1.10 Genotipos de agua potable clorada (piscinas):** en esta investigación los genotipos identificados en agua de piscinas fueron: 92% *Acanthamoeba* pertenecientes al genotipo T4, un 4% al genotipo T2 (aislado en pacientes con queratitis y EGA) y un 4% al genotipo T3. El genotipo T4 encontrado en alto porcentaje en este tipo de agua y siendo el mayoritario aislado en pacientes con queratitis, se debe educar a la población, especialmente a los usuarios de lentes de contacto en tomar las medidas preventivas al bañarse en las piscinas, con este objetivo se diseñó un díptico para ser distribuido a la población. En un estudio realizado en Brasilia, 4 piscinas fueron genotipo T5 y 3 genotipos T4, (Alves et al, 2012). En otro estudio realizado en el sur de Brasil, en la secuenciación identificaron 1 genotipo T3, 3 genotipos T4 y 9 genotipos T5, (Caumo et al, 2011).

### **3.2 Genotipos según estaciones del año en muestras de agua**

El único genotipo que se encontró en todas las estaciones fue el T4, el genotipo T2 sólo se encontró en verano, el genotipo T3 en otoño y verano y el genotipo T11 en invierno, otoño y primavera. En verano, cuando son mayoritariamente utilizadas las aguas con fines recreativos se identificaron los genotipos T2, T3 y T4, todas aisladas en pacientes con queratitis. No se pudo realizar análisis estadístico de asociaciones porque hay muchas frecuencias menores de 5 o iguales a cero, predominando el genotipo T4 en todas las épocas del año. En un

estudio estacional realizado en agua de embalse de Taiwán también encontraron el genotipo T4 en todas las estaciones del estudio, a diferencia de este estudio, el genotipo T2 fue identificado en invierno. Los genotipos T3 y T11 también fueron encontrados en otoño y además encontraron el genotipo T10 en otoño e invierno. (Tzeng K et al, 2013).

## **C. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SUELOS**

### **1. Análisis de aspectos generales sobre la diversidad de metodologías de toma de las muestras y procesamientos.**

En relación a metodologías de toma de muestra y procesamiento, en el caso de las muestras de suelo ocurre lo mismo que con las muestras de agua, diversidad de procedimientos técnicos que pueden influir en los resultados finales, algunos de ellos se mencionan a continuación:

#### **1.1 Toma de las muestras**

En cantidad de muestra y procesamiento de las muestras de suelo en este trabajo, se hizo basado en la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-132-SCF 1-2006, que se refiere a muestreo de suelos. En las investigaciones revisadas, se observó que las cantidades de muestras varían entre 2 g hasta 200 g. En un estudio realizado en Tenerife la cantidad a analizar fue 2 gr, (Lorenzo-Morales et al, 2005), en otro estudio, realizado en Jamaica, analizaron 10 g de suelo, (Todd et al, 2015). En otro estudio realizado en Irán, analizaron, entre 100-200 g de suelo; (Rahdar et al, 2012). En un estudio en Florida, EEUU, 200 g., (Booton et al, 2004). Otra modalidad fue la que emplearon en un estudio en la Antártica, que consistió en tomar la muestra de suelo con una espátula estéril, (Brown et al, 1982), otra forma fue empleada en un estudio realizado en Brasil que consistió en tomar la muestra de suelo con el borde de un portaobjeto estéril, (Alves et al, 2012).

## 1.2 Análisis de aspectos metodológicos.

En este estudio, para obtener la cantidad de muestra para análisis se trabajó mediante la metodología del cuarteo (Norma Mexicana 132-SCF, 2006), que consiste en dividir la muestra en 4 partes, tomar una de las partes y dividirla nuevamente hasta obtener la cantidad final de 2 g, la que se diluyó en 100 ml de agua destilada estéril. Las muestras se procesaron en duplicado mediante la misma metodología que las muestras de agua, basada en el Standard Method, 2005. En un estudio en Irán, el suelo lo diluyeron en agua destilada, concentraron mediante filtración, con flitros de nitrocelulosa de 0,45um, (Rahdar et al, 2012). Otra metodología utilizada es tomar la muestra con portaobjeto y depositarla directamente en el medio de cultivo ANN con *Escherichia coli* muertas, (Alves et al, 2012). En un estudio en Florida, EEUU, diluyen 200 g de suelo en 500 ml buffer por 1 minuto, 50 ml de suspensión y posteriormente, lo concentraron por centrifugación y sembraron 100 ul en placa de cultivo, (Booton et al, 2004). En investigación en los Países Bajos, Sardinia y El Tíbet, realizaron una suspensión mezclando 50 g de suelo seco en 50ml de agua destilada, agitaron 20 minutos y transfirieron 100 µl a 20 placas, examinando los días 10 a 14 y 24 a 28, (Geisen et al, 2014). En Tenerife, España, tomaron 2 g de suelo y lo diluyeron en 20 ml de agua destilada estéril, 150 µl de la dilución inocularon en medio ANN con *Escherichia coli* muertas por calor, incubadas a 25°C hasta 2 semanas, (Lorenzo-Morales, 2005).

**1.2.3 Tiempo incubación:** en este trabajo la incubación fue de 10 días, en un estudio en la Isla Gran Canaria, (Reyes-Batlle et al, 2014), la incubación fue de 7 días, en el caso del estudio en el desierto de Negev, Israel, la incubación fue de 7 a 10 días, (Rodríguez-Zaragoza et al, 2005), 2 semanas, en Tenerife, (Lorenzo-Morales et al, 2005), en un estudio en Países Bajos, Sardinia y El Tíbet, examinaron las placas durante 28 días, (Geisen et al, 2014) y en un estudio en Irán fue de 2 meses, (Rhadar et al, 2012).

## **2. Análisis morfológico de muestras de suelo.**

### **2.1 *Acanthamoeba* spp en muestras de suelo**

Los suelos fueron los que presentaron mayor presencia de *Acanthamoeba* spp., con una positividad del 76%, encontrando positivos en todos los tipos de muestras. Al analizar la positividad en relación a estaciones del año, el mayor porcentaje se obtuvo en invierno seguido por la primavera ambos con porcentajes similares (88% y 84%), en verano y otoño también con porcentajes similares, (64 y 60%). No se observa relación con temperaturas ambientales en el momento de toma de las muestras ni con ubicación geográfica de ellas. Menor positividad encontraron en el Municipio de Jamaica, con 63,9% en variedad de suelos como en este estudio, (Todd et al, 2015). Otras experiencias fueron las siguientes: en 24 muestras de suelo de Isla Gran Canaria obtuvieron 62,5%, (Reyes-Batlle et al, 2014). En estudio en 65 muestras de suelo de Países Bajos, Sardinia y El Tíbet, un 35% resultaron positivos, (Geisen et al, 2014). En Tenerife, en suelo encontraron un 37,7% y en arena 42%, (Lorenzo-Morales et al, 2005). En Florida, EEUU, se aisló *Acanthamoeba* spp. en un 40%, (Booton et al, 2004). Los porcentajes de positividad en suelo y en arena son menores a los obtenidos en esta investigación. Las 4 muestras de sedimentos de la Cueva Lascaux en Francia resultaron positivas, (García-Sánchez et al, 2013). En Brasil, 1 de 2 suelos fue positiva, (Alves et al, 2012). Cualquier tipo de suelo es un reservorio de *Acanthamoeba* que es su hábitat y que ambientalmente participan en la depuración y conservación de suelo y aguas.

**2.2 Termotolerancia:** en este trabajo la termotolerancia fue de 100% positiva a 42°C y negativa a 60°C. En un estudio realizado en Florida, EEUU, incubaron los cultivos a temperaturas de 37°C, 40°C y 42°C, todas crecieron a 37°C, a 40°C, crecieron 1 muestra de arena genotipo T5, 2 muestras de suelo genotipo T5 y 1 muestra de suelo genotipo T11, a 42°C 1 muestra de arena genotipo T5, (Booton G. et al, 2004). En un estudio efectuado en el Municipio de Jamaica incubaron a temperatura ambiente, 29°C, 37°C y 41°C, el 73,9% de las muestras fueron termotolerantes a 37°C, (Todd et al, 2015). Estudio en Países Bajos, Sardinia y El

Tíbet, la termotolerancia fue a 34°C, 37°C y 42°C. La metodología utilizada fue que los cultivos que crecieron a 37°C, se incubaron posteriormente a 42°C por 1 día y luego incubados a 37°C por 1 semana, se revisó cada 24 horas por 1 semana, 56% crecieron a 37°C y 38% a 42°C, los genotipos T16 no crecieron a altas temperaturas, (Geisen et al, 2014). En Tenerife, 35 muestras de suelo y todas las muestras de arena fueron positivas a 37°C, (Lorenzo-Morales et al, 2005). En Maryland se tomaron muestras de suelo de 7 sitios y encontraron 58% de termotolerancia a 37°C y 39°C, (Sawyer et al, 1989).

### **3. Análisis molecular de *Acanthamoeba* spp. en suelos.**

#### **3.1 Genotipos de *Acanthamoeba* spp. en suelos.**

En este estudio, se identificó en un 73% el genotipo T4, encontrándose en todos los suelos, excepto en suelo de humedal, con altos porcentajes en todas las zonas del país. De acuerdo a lo descrito se confirma al genotipo T5 como segundo en frecuencia, este genotipo se aisló en todos los tipos de suelo excepto suelo de cascada. En relación a otras investigaciones, en un estudio realizado en muestras de suelo de la Isla Gran Canaria, los genotipos T4 y T5 coincidieron con los aislados en este trabajo y también tuvieron el predominio del genotipos T4 en un 80%, además aislaron el genotipo T2; (Reyes-Batlle et al, 2014). En Irán, identificaron los genotipos T4 y T5, (Rahdar et al, 2012). En el Municipio de Jamaica obtuvieron un 63,9% en muestras de distintos tipos de suelo identificando los genotipos T4, T5 y T11, predominando ampliamente el primero, (Todd et al, 2015). En Florida, EEUU, en muestras de arena encontraron los genotipos T4, T5 y T2, (Booton et al, 2004). En los Países Bajos, Sardinia y El Tíbet además de identificar los mismos genotipos de este estudio, detectaron los genotipos T7, T13, T14, T16, (Geisen et al, 2014). En muestras de sedimentos de la Cueva Lascaux en Francia, aislaron los genotipos T4, T7 y T14, (García-Sánchez et al, 2013).

## **B. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE VEGETALES**

### **1. Análisis de aspectos generales sobre la diversidad de metodologías de toma de las muestras y procesamientos.**

Son pocos los estudios realizados en vegetales y de acuerdo a la bibliografía revisada, no se encontró metodologías descrita por organismos internacionales en relación a este tipo de muestra. En este caso ocurre la misma situación de agua y suelos en relación a variadas metodologías.

**1.1 Cantidad de muestra:** en este trabajo, de acuerdo al tamaño, se analizó el vegetal completo o parte de él. En las publicaciones revisadas, en 2 estudios, los autores analizaron 1 g de cada muestra, (Valencia LA., 2012; Orosz E., et al, 2013), otros investigadores analizaron 500 a 550 g de lechuga y 250 a 300 g en espinaca, (Gourabathini et al, 2008).

**1.2 Análisis de aspectos metodológicos:** en este estudio, muestra completa o una parte de ella, se diluyó en 100 ml de agua destilada estéril y se procesó en duplicado mediante la metodología mencionada anteriormente para agua y suelo, concentrando en copa de filtración. Se describen brevemente algunas de las metodologías utilizadas por diferentes investigadores para análisis de vegetales. En un estudio se tomó 1 g de lechuga y espinaca de diferentes partes del vegetal y en el caso de zanahoria. Con bisturí estéril se cortó 1 g de la corteza, se depositó en bolsa estéril con 100 ml de tampón fosfato salino estéril y se colocó en el Stomacher-400 por 5 minutos, sembrando 1 µl del homogenizado en placa con ANN con *Escherichia coli*. Las placas fueron selladas y se dejaron a temperatura ambiente, revisando cada 24 horas, realizando traspasos a placas con cultivo nuevo para tener réplicas libres de contaminantes, (Valencia LA. 2012). En otro estudio, realizado en Brasil, se analizó Bromelias, la muestra se tomó pasando una torunda sobre la superficie de las hojas y depositándola en tubos de 50 ml con agua destilada estéril, se dejaron 2 horas para que sedimentara y luego centrifugaron a 250 g por 10 minutos y incubadas a 30°C hasta 15 días, (Fontes M. et al, 2013). En un estudio realizado en Hungría, las muestras de Rizósfera y suelo fueron tomadas en una profundidad de 0 a 20 cm.

Un gramo de las muestras fueron disueltas en 10 ml de buffer PBS estéril y 500µl fue sembrado en placa con ANN y *Escherichia coli* muerta por calor e incubadas a 36°C, las placas fueron monitoreadas por 72 a 96 horas, (Orosz et al, 2013). Otra investigación fue realizada en callampas comestibles, se raspó la superficie con una navaja, la recopilación del material sobre la cuchilla fue transferida por medio de una micro espátula a la superficie de una placa con agar al 2% con emulsión de *Escherichia coli* (ATCC 25922) o *Proteus mirabilis*, los cultivos fueron conservados en oscuridad a temperatura ambiente y fueron examinados desde el tercer día de incubación hasta los 10 días. (Napolitano J., 1982).

## **2. Análisis morfológico de muestras de vegetales.**

Los vegetales presentaron una positividad de 45%. Al analizar la positividad en relación a estaciones del año, el mayor porcentaje se obtuvo en verano con un 53% y el menor en otoño con 25%. No se observa relación de estos resultados con temperaturas ambientales en el momento de toma de las muestras ni con ubicación geográfica de ellas.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron: 60% en lechugas, 33,3% zanahorias y 33,3% espinacas, en Tenerife, se estudiaron 47 vegetales, encontrando 50% lechugas y 10% zanahorias, las espinacas fueron negativas, Valencia LA., 2012). En una investigación sobre contaminación de amebas en lechugas, en los vegetales que tenían suciedad visible se encontró 59,1% de amebas en las lechugas que no tenían suciedad visible fue de 53,1%, las lechugas enjuagadas presentaron 46,1% de positividad contra las no enjuagadas con un 56,9% de positividad, (Napolitano et al, 1984). En California realizaron un estudio dirigido a analizar la interacción entre patógenos causantes de brotes de origen alimentario y protozoos aislados de lechugas y espinacas, se aisló 1 ameba en lechuga, la que correspondió a una *Acanthamoeba palestinensis*., (Gourabathini, et al, 2008). Otro estudio realizado en Nueva York sobre amebas en lechugas, el protozoo más frecuente fue *Acanthamoeba*. En una investigación realizada en Nueva York, se encontró un 96% de amebas en

callampas comestibles y el género más frecuentemente fue *Acanthamoeba*, (Napolitano J., 1982). En un estudio en Brasil en plantas de Bromelias, encontraron *Acanthamoeba* en un 90%, (Fontes M. et al, 2013). En Hungría, se aisló *Acanthamoeba* en 12 muestras de Rizósfera del maíz y plantas de Lucerna, fueron positivas 6 Rizósferas del maíz y 5 plantas de Lucerna, (Orosz E., et al, 2013). Experiencia muy diferentes fueron los resultados en un estudio en Bélgica en Protozoos de vida libre en 64 lechugas (*Lactuca sativa*) y que actúan como agentes de brotes de origen alimentario y protegen a bacterias internalizadas contra condiciones adversas tales como desecación y exposición a desinfectantes. Fueron aisladas varias especies de amebas (*Hartmannella vermiformis*, *Vannella simplex*, *Vahlkampfia* sp, ciliados y flagelados, sin embargo, no encontraron *Acanthamoeba* spp., (Mario et al, 2011). Las amebas por las actividades agrícolas y de regadío se trasladan a los alimentos y ellas pueden transportar agentes patógenos.

**2.2 Endosimbiosis** La capacidad de *Acanthamoeba* spp. para actuar como un reservorio de bacterias ha llamado mucha la atención, porque la mayoría de las bacterias involucradas son patógenos humanos. Algunas especies de bacterias pueden crecer y reproducirse dentro del citoplasma y llegar a ser simbiote, esta situación también se ha visto con virus, hongos y protozoos. *Acanthamoeba* puede jugar un rol significativo en la transmisión de algunas bacterias patógenas en agua potable, al actuar como hospederos de ellas y así protegerlas de condiciones adversas, permitiéndole evadir las defensas del hospedero, resistir la acción de los antibióticos y aumentar su virulencia. Se ha descrito que aproximadamente el 20 al 24% de los aislados clínicos y ambientales de *Acanthamoeba* albergan bacterias intracelularmente. El rol de las AVL como vehículo de transmisión de algunos patógenos ha tomado mucha importancia, una de las primeras bacterias descritas fue *Legionella pneumophila*, la cual tiene la capacidad de reproducirse en el interior del trofozoíto, lo que sería importante en la persistencia y dispersión de este organismo en el ambiente, también se ha descrito que sería más virulenta después de una permanencia en *Acanthamoeba*. Otras bacterias descritas como endosimbiontes patógenas para el ser humano

son: *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp, *Yersinia* spp, *Escherichia coli* 0157, *Shigella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Rickettsia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, etc. (Nwachuku et al, 2003; Khan NA, 2006; García et al, 2013; Goñi et al, 2014). En un estudio realizado con algunas bacterias patógenas oportunistas de brotes de origen alimentario en presencia de *A. polyphaga* los autores sugieren ser potencialmente diseminador en el medio ambiente, destacando el posible rol de este protozoo en contaminación alimentaria, (Anacarso I. et al, 2011).

**2.3 Termotolerancia:** los 32 vegetales positivos analizados en este estudio fueron positivos en cultivo incubado a 42°C, sugiriendo su potencial patogenicidad. Distinta fue la situación en una investigación sobre la presencia de *Acanthamoeba* en 10 plantas de Bromelias en el sur de Brasil, la termotolerancia se realizó a 37°C y 42°C, todas crecieron a 37°C y ninguna a 42°C. (Fontes M. et al, 2013).

### **3. Análisis molecular de *Acanthamoeba* spp en vegetales.**

#### **3.1 Genotipos de *Acanthamoeba* spp en vegetales.**

Los genotipos identificados fueron T3, T4, T5, T11 y T15, siendo el de mayor positividad el genotipo T4 con un 72%. El genotipo T3 se encontró sólo en espinaca, el genotipo T4 se identificó en perejil, repollo, apio, menta, coliflor, orégano, berro, albahaca, ruda y hojas de porotos verdes con un 100%. Acelga con un 75%, cilantro un 67%. Lechuga, zanahoria y achicoria 50%. El genotipo T5, en zanahoria con un 50% y lechuga con un 17%. El genotipo T11 se encontró sólo en lechuga. El genotipo T15 en puerro con un 100%, achicoria con un 50%, cilantro con un 33%, acelga con 25% y lechuga con 17%. En otras investigaciones se observó lo siguiente: en un estudio realizado en Tenerife encontraron los mismos genotipos en lechuga y zanahoria, en 7 lechugas con *Acanthamoeba*, 6 correspondieron a genotipo 4 y 1 a genotipo T15, en el caso de las zanahorias se identificaron 2 positivas genotipo T4, (Valencia LA, 2012). En una investigación en otro tipo de vegetales que se realizó en Brasil, en Bromelias,

encontraron 5 genotipos T2/6, 3 genotipos T4 y 1 genotipo T16, (Fontes M. et al, 2013). En la investigación realizada en Hungría en rizósfera del maíz y plantas de Lucerna, los genotipos identificados fueron los siguientes: 5 rizósferas de maíz y 1 planta de Lucerna fueron genotipo T4, 1 rizósfera de maíz y planta de Lucerna fueron genotipo T11, 2 lucernas fueron genotipo T2//6 y 1 lucerna fue genotipo T8, (Orosz E., et al, 2013).

Este estudio ha contribuido a aportar una primera información sobre la proporción y las poblaciones de *Acanthamoeba* spp. que se encuentran en diversas muestras de agua, suelos y vegetales en Chile continental e insular. Los resultados muestran la existencia de *Acanthamoeba* spp. en todo el país, aun así, todavía no se ha logrado sensibilizar a las autoridades de salud para cambio de normativa en agua, con el fin de realizar las actividades de vigilancia relacionada con parásitos, sólo se puede colaborar en educación a la población, en este caso, a los usuarios de lentes de contacto, entregando material de prevención como dípticos o trípticos y a los profesionales de la salud entregar el conocimiento para que tomen conciencia de las patologías que pueden causar las AVL, específicamente *Acanthamoeba* spp. y pensar en ellas ante un diagnóstico diferencial en las que podrían estar involucradas.

#### **E. Análisis filogenético de *Acanthamoeba* spp.**

En el análisis de los árboles filogenéticos se observa que entre las *Acanthamoeba* T4 procedentes de aguas aparecen dos grupos con secuencias muy similares, excepto la w 270-2011. y lo mismo ocurre con los genotipos T3 y T11. Limitaciones en el tiempo han impedido llevar a cabo un estudio más detallado de variabilidad genética, pero dado que las muestras han sido tomadas en diferentes lugares y diferentes años, los resultados obtenidos sugieren que es pequeña la diversidad de poblaciones que se encuentra en el país. En el caso de las *Acanthamoeba*

pertenecientes a muestras de suelos se observa una mayor diversidad intergenotipo, aunque también se observan agrupaciones mayoritarias en los genotipos T4 y T5.

En el caso de los vegetales ocurre lo mismo. La observación del árbol filogenético que incluye todas las secuencias muestra similitud entre amebas aisladas en aguas, suelos y vegetales, que necesariamente deben de ser reflejo de la interconexión existente entre los nichos ecológicos estudiados.

De acuerdo al análisis de los 20 genotipos descritos en bibliografía para *Acanthamoeba* (94 secuencias de referencia), en este trabajo fueron identificados los genotipos T4, T5, T15, T11, T3 y T2. De acuerdo a las variantes predominantes del genotipo T4 por tipo de muestras, se determinó que en las muestras aisladas desde agua y suelo se encontraron las cinco variantes predominantes, mientras que en los aislados de vegetales no se halló el genotipo T4/3. El genotipo T4 variante T4/1 ha sido identificado anteriormente en muestras clínicas en España y Alemania (Ejemplo Genbank: KP863876.1). El genotipo T4 variante T4/2 ha sido identificado anteriormente en muestras clínicas de Irán y en Corea (Ejemplo Genbank: JN036639.1). El genotipo T4 variante T4/3 ha sido identificado anteriormente en muestras clínicas en Costa Rica e Italia (Ejemplo Genbank: KP677464.1). El genotipo T4 variante T4/4 ha sido identificado anteriormente en muestras de agua en Italia (Ejemplo Genbank: KP756953.1). El genotipo T4 variante T4/5 ha sido identificado anteriormente en muestras clínicas en Chile (Genbank: JF702906.1). Las variantes T4/7, T4/22, T4/24, T4/29, T4/32, T4/33, T4/35, T4/36, T4/37, T4/38, T4/39, T4/40, T4/41 y T4/42 se encuentra con nucleótidos ambiguos, lo que indicarían una mezcla de distintas variantes.

El total de las variantes del genotipo T5 se encontraron en las muestras de suelo, mientras que la variante T5/2 solo se encontró en muestras de vegetales. El genotipo T5 variante T5/1 y variante T5/2 han sido identificado previamente en muestras clínicas y ambientales (suelo) en Tailandia como *Acanthamoeba lenticulata* (Genbank: KF733261.1 y F733258.1).

La variante T15/1 del genotipo T15 identificada en muestras de suelo de este estudio, también se ha identificado en Italia, en muestras de agua, junto a las variantes T15/2, T15/3 y T15/5 (Genbank: KP756948.1), mientras que la variante T15/4 se ha identificado en muestras clínicas de pacientes con queratitis en Eslovaquia (Genbank: GQ905495.1).

En relación a las 3 variantes del genotipo T11, la predominante T11/1 se identificó en las 3 muestras del estudio. Esta variante junto a la variante T11/2 se ha identificado anteriormente en muestras de Irán. Esta variante se encuentra identificada por Hooshyar,H. et al. 2015 como genotipo T4 (Genbank LC085425). El genotipo T11 está estrechamente relacionado con los genotipos T4 y T14, por lo cual, esta situación podría llevar a genotipificación errónea, para esto es recomendable usar árboles filogenéticos robustos que incluyan método estadístico, como por ejemplo el método estadístico de máxima verosimilitud.

La única variante del genotipo T3 ha sido identificada anteriormente en muestras ambientales aisladas en equipo de aire acondicionado en Japón (Genbank: AB594480.1)

En el genotipo T2 existen 2 variantes que han sido identificadas anteriormente en Egipto en muestras ambientales procedentes de agua (Genbank: DQ992193.1)



**CONCLUSIONES Y  
RECOMENDACIONES**



## CONCLUSIONES

---

1. Se encuentra *Acanthamoeba* spp en todas las Regiones y zonas del país mediante análisis fenotípico en todas las estaciones del año, lo que indica que eventualmente podrían existir especies patógenas que pueden afectar la salud de la población, especialmente en usuarios de piscinas.

2. De acuerdo a la clasificación en los Grupos de Pussard y Pons se muestra que las *Acanthamoeba* spp aisladas se incluyeron en los Grupos II y III, quedando incorporadas en el Grupo II el 84% de los aislados que corresponden a las especies descritas en casos de queratitis. En el Grupo III los genotipos aislados se encuentran en casos de queratitis y EGA. En el Grupo II el predominio es del genotipo T4 y el Genotipo T5 en el Grupo III, genotipos que se encuentran en primer y segundo lugar respectivamente en estudios ambientales, por lo tanto, todos son potencialmente patógenas de acuerdo a lo descrito en la literatura.

3. El análisis de los resultados ponen en evidencia que todos los genotipos identificados son causantes de patología en el ser humano, por lo cual, pueden eventualmente ser de riesgo para la salud en las XV Regiones del país, especialmente con muestras de agua que fueron analizadas en todas las Regiones. Además, cabe destacar que el aislamiento de *Acanthamoeba* spp en todas las zonas, las cuales presentan características muy diferentes, en cuanto a clima, disponibilidad de agua, tipo de suelos demuestra su ubicuidad y su potencial riesgo, destacando el predominio del genotipo T4 en aguas, suelos y vegetales.

4. El genotipo T4 se encuentra mayoritariamente en las aguas recreacionales siendo también el que se encuentra en mayor proporción en aguas de consumo, por lo que estas aguas suponen un riesgo potencial entre los usuarios de lentes de contacto.

5. Las piscinas que no cumplen el Reglamento resultaron positivas en mayor proporción que las que si lo cumplen, para *Acanthamoeba*. En sus muestras de agua se han identificado los genotipos T2, T3 y T4, todos ellos descritos como causantes de queratitis en humanos.

6. La termotolerancia al ser uno de los factores de virulencia que colaboran en la determinación de los genotipos patógenos, contribuye a confirmar que los aislamientos son posiblemente patógenos, lo que se suma a que los genotipos aislados corresponden a los identificados como causantes de patología en casos diagnosticados en diferentes países.

## RECOMENDACIONES

---

1. Es necesario realizar otros estudios para detectar AVL en agua potable con mejoramiento en la sensibilidad de las metodologías tanto en las Plantas de Tratamiento de Aguas como en las redes con el fin de volver a evaluar la calidad de las aguas desde el punto de vista de estas amebas y determinar el posible riesgo de salud pública a la población.

2. Las inspecciones periódicas realizadas para evaluar los parámetros exigidos siguen siendo necesarios, aunque el mayor aporte que se puede hacer desde el punto de vista de la salud pública es colaborar en educar a la población en el uso de los lentes de contacto y cumplir con las medidas de higiene de ducharse previo al ingreso, lo que se puede efectuar mediante entrega de material de prevención y

además sensibilizar a los clínicos para que tengan presente este protozoo como agente de riesgo.

3. Es importante la identificación de otros géneros de AVL que fueron observados por la posibilidad de identificar otros géneros causantes también de patologías en el ser humano y que también pueden tener relación endosimbiótica con microorganismos patógenos protegidos por estas amebas que al ingresar al organismo este se puede infectar con algún agente que cause una patología de tipo intestinal.

4. La dispersión de metodologías realizadas por diversos investigadores pueden afectar la sensibilidad de las técnicas, por lo tanto, del resultado final, dificultando la comparación entre ellos y pueden afectar el conocimiento real de la epidemiología de *Acanthamoeba* spp. en el mundo.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abedkhozasteh H., Niyiyati M., Rahimi F., Heidari M., Farnia S., Rezaeian M. First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. Iranian Journal of Parasitology. 2013, 8(3):481.
2. Adamska M., Leonska-Duniec A., Lanocha N. and Skotarczak B. Thermophilic potentially pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. Acta Parasitologica. 2014, 59(3): 433-441.
3. Adl SM., Simpson Ag., Farmer MA., Andersen RA., Andersen OR., Barta JR., Bowser SS., Brugerolle G., Fensome RA., Frederico S., James TY., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane CE., Lewis LA., Lodge J., Lynn DT., Mann DG., Mccourt RM., Mendoza L., Moestrup O., Mzley-Standridge SE., Nerad TA., Shearer CA., Smirnov AV., Taylor MF. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. J. Eukaryotic Microbiol. 2005, 52(5):399-451.
4. Al-Herrawy A., Bahgat M., Mohammed A-E., Ashour A., Hikal W. *Acanthamoeba* species in Swimming Pools of Cairo, Egypt. Iranian J Parasitol. 2014, 9 (2):194-201.
5. Al-Herrawy A., Bahgat M., Mohammed A., Ashour A., Hikal W. Morpho-Physiological and Biochemical Criteria of *Acanthamoeba* spp. Isolated from the Egyptian Aquatic Environment. Iranian J Parasitol. 2013, 8(.2):302-312.
6. Alves D. de S., Moraes A.S., Nitz N., de Oliveira M.G., Hecht M. M., Gurgel-Gonçalves R., Cuba CA. Occurrence and Characterization of *Acanthamoeba* similar to genotype T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasilia, Federal District, Brazil. Experimental Parasitology. 2012, 131:239-244.
7. Alves D.de S. Advances in the isolation and biological and molecular characterization of *Acanthamoeba* spp (Acanthamoebidae)-Free-Living Amoeba: Experimental determination of Pathogenic potential.Revista de Patología Tropical. 2012, 41(1):249-252.

8. Anacarso I., De Niederhäusern S., Messi P., Guerrieiri E., Iseppi R., Sabia C. and Bondi M. *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *Journal of Basic Microbiology*. 2011, 51: 1-8.
9. Asociación de Instituciones de Salud Previsional (ISAPRE). [www.isapre.cl](http://www.isapre.cl)
10. Astorga B., Lorenzo-Morales J., Martín Navarro C.N., Alarcón V., Moreno J., González A.C., Navarrete E., Piñero J.E., and Valladares B. *Acanthamoeba* Belonging to T3, T4 y T11: Genotypes Isolated from Air-Conditioning in Santiago, Chile. *The Journal Eukariot. Microbiol.* 2011 58(6):542-544.
11. Astorga B. Keratitis by *Acanthamoeba* spp, a great threat to users of contact lenses. *Jpn. J. Protozool*, 2007, 40(2)179.
12. Astorga B., Kuster C. y Weitz JC. Primer aislamiento en Chile de una ameba de vida libre en usuario de lente de contacto con queratitis grave. *Rev. Méd Chile*. 1993, 121:1340-1341.
13. Badirzadeh A., Niyati M., Babaei Z., Amini H., Badirzadeh H., Rezeian M. Isolation of Free-Living Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil, Providence, Irán. *Irian J Parasitol*. 2011, (6)1-8.
14. Bagheri H.R., Shafiei R., Shafiei F. and Sajjadi S.A. Isolation of *Acanthamoeba* spp. From Drinking Waters in Several hospitals of Iran. *Iran J Parasitol*. 2010, 5(2):19-25.
15. Baquero R.A., Reyes-Batlle M., Nicola G.G., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Esteban J.G., Valladares B., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Lorenzo-Morales J. Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathogens and Global Health*. 2014, 108(4) 206-214.

16. Barbeau J. Buhler T. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol.* 2001,152(8):753-60.
17. Barete S., Combes A., de Jonckheere J.F., Datry A., Varnous S., Martínez V., García S., Caumes E., Capron F., Francés C., Gibert C. and Chosidow O. Fatal Disseminated *Acanthamoeba lenticulata* Infection in a Heart Transplant Patient. *Emerging Infectious Diseases.* 2007, 13( 5):736-738.
18. Begg A.P., Todhunter K., Donahoe S.L., Krockenberger M., Šlapeta J. Severe Amebic Placentitis in a Horse Caused by an *Acanthamoeba hatchetti* Isolate Identified Using Next-Generation Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology.* 2014, 52(8)3101-04.
19. Biddick C., Rogers L., and Brown T.J. Viability of Pathogenic and Nonpathogenic Free-Living Amoebae in Long-Term Storage at a Range of Temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 1984, 48(4): 859-860
20. Boost M., Cho P., Lai S., Sun W-M. Detection of *Acanthamoeba* in Tap Water and Contact Lens Cases Using Polymerase Chain Reaction. *Optomd Vis Sci.* 2008, 85 (7) 526-30.
21. Booton G.C., Rogerson A., Bonilla T.D., Seal D.V., Kelly D.J., Beattie T.K., Tomlinson A., Lares-Villa F., Fuerst P.A. and Byers T.J. Molecular and Physiological Evaluation of Subtropical Environmental Isolates of *Acanthamoeba* spp., Causal Agent of *Acanthamoeba* Keratitis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2004, 51(2):192-200.
22. Booton G.C., Visvesvara G.S., Byers T.J., Kelly D.J. and Fuerst P.A. Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with Nonkeratitis Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43: 1689-1693.

23. Brown TJ., Cursons RT. Pathogenic free-living amoebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. *Scand J Infect Dis.* 1977, 9(3):23-40
24. Brown T.J., Cursons., R.T.M., Keys, E.A. Amoebae from Antarctic soil and water. *Appl Environ Microbiol.* 1982, 44(2)491-493.
25. Buerano CC., Trinidad AD., Syney L., Fajardo N., Cua IY., Baclig MO and Natividad FF. Isolation of *Acanthamoeba* genotype T4 from a non-contact lens wearer from the Philippines. *Tropical Medicine and Health.* 2014, 42(4):145-147.
26. Carlesso AM., Mentz MB., da Machado ML Carvalho A. Nunes TE., Mashio VJ, Rott MB. Characterization of Isolates of *Acanthamoeba* from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs. *Curr Microbiol.* 2014, 68:702-707.
27. Caumo K., Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop.* 2011,117(3):233-235.
28. Cervero-Aragó S., Rodríguez-Martínez S., Canals O., Salvado H. and Araujo R.M. Effect of thermal treatment on free-living amoeba inactivation. *J Appl Microbiol.* 2013, 116(3):728-736.28.
29. Centeno M., Rivera F., Cerva L., Tsutsumi V., Gallegos E., Calderón A., Ortiz R., Bonilla P., Ramírez E., Suárez G. *Hartmannella vermiformis* Isolated from the cerebrospinal Fluid of a Young Male Patient with Meningoencephalitis and Bronchopneumonia. *Archives of Medical Research.* 1996, 27(4): 579-586.
30. Chow FC. And Glaser CA. Emerging and reemerging neurologic infections. *Neurohospitalist.* 2014, 4(4):173-184.
31. CONAMA (Comisión Nacional del medioambiente) Perfil ambiental de Chile, 1994.

32. Corsaro D. Venditti. D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res.* 2010,107:233-238.
33. Coşkun K. A., Özçelik S., Tutar L., Elaldi N. and Tutar Y. Isolation and Identification of Free-Living Amoebae from Tap Water in Sivas, Turkey. *BioMed Research International.* 2013, dx.doi.org/10.1155/2013/675145
34. Cruz M., Ortiz J.V., Ladrón de Guevara C. Estudio clínico-microbiológico de tres casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. *Enf Emerg.* 2004, 6(2):98-102
35. Cuevas M., Smoje G., Jofré L., Ledermann W., Noemí I., Berwart F., Latorre JJ. Y González S. Meningoencefalitis granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect.* 2006, 23 (3): 237-242.
36. Da Rocha-Azevedo B., Tanowitz H.B. and Marciano-Cabral F. Review Article. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* Volume 2009, Article ID 251406. 14 pages. Doi: 10.1155/2009/251406
37. De Jonckheere JF. Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface waters. *J Protozool.*1981, 28(1):56-59.
38. Decreto N°209, 2002, modif 43/06, 2006 del Ministerio de Salud. Reglamento de piscinas.
39. Dendana F., Sellami H., Jarraya F., Sellami A., Makni F., Cheikhrouhou F., hacchicha J. & Ayadi A. , Free-Living Amoebae (FLA): Detection, Morphological and Molecular Identification of *Acanthamoeba* genus in the Hydraulic System of an Haemodialysis Unit in Tunisia. *Parasit.* 2008, 15: 137-142.

40. Di Cave D., Monno R., Bottalico P., Guerriero S., D'Amelio S., D'Orazi C., Berrilli F. *Acanthamoeba* T4 and T5 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009, 28:607-612.
41. Dirección Meteorológica de Chile. [www.meteochile.cl](http://www.meteochile.cl) (Año consulta: 2015)
42. Documento técnico PNT-10-02-2008. "Procesamiento de muestras oculares para detección y cultivo de *Acanthamoeba*. Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.
43. Dunnebacke TH., Schuster FL, Yagi S., and Booton GC. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology*. 2004, 150: 2837-2842.
44. Dupuy M., Berne F. Herbelin P., Binet M., Berthelot N., Rodier MH., Soreau S., Héchard Y. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2014, 217(2-3): 335-339.
45. Dyková I., Pindová Z., Fiala I., Dvůráková H and Machácková. Folia Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lesions. *Parasitologica*, 2005, 52: 295-303.
46. Eftekhari M., Athari A., Haghghi A., Mosaffa N., Shahram F., Abadi A. Seroprevalence of *Acanthamoeba* Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patient by IFAT, Tehran, Irán 2007. *Iranian J Parasitol*. 2010, 5(1):53-40.
47. Ertabaklar H., Türk M., Dayanir V., Ertuğ S., Walochnik J. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res*. 2007, 100:241-246.

48. Farkas A., Ciatarăș D and Brândușa Bocoș. Biofilms Impact on Drinking Water Quality. Capítulo 7 del libro Ecological Water Quality- Water Treatment and Reuse. 2012. Editado por Kostas Voudouris. ISBN 978-953.
49. Fernández MT. 2014. Tesis “Caracterización molecular de AVL e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la salud pública”. Universidad de Zaragoza
50. Fluvía C., Mascaró C., Guevara D.C., Pérez M.I., Mascaró M.L., Osuna A. Aislamiento de amebas de vida libre a partir de aguas minerales y mineromedicinales envasadas. Revista Ibérica de Parasitología. 1983, 43(1):33-38.
51. Fontes LM., Salton J., Caumo K., Broetto L., Rott M.B. Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. From bromeliads in Southern Brazil. Experimental Parasitology. 2013, 134:290-294.
52. Fouque E., Trouilhé M.C., Thomas V., Humeau P., Héchard Y. Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration. Exp Parasitol. 2014, (145)62-8.
53. Fuerst PA, Booton GC, Crary M. Phylogenetic Analysis and the Evolution of the 18S rRNA Gene Typing System of *Acanthamoeba*. J. Euk. Microbiol. 2015, 62(1):69-84.
54. Galarza C., Gutiérrez E., Uribe M., Ramos W., Ortega A., Ávila J., Hanco J., Espinoza Y., Espinoza M., Ñavimcopa M., Gámez D. Amebas de vida libre en lesiones cutáneas. Reporte de 4 casos. Dermatología Peruana. 2006,16(1):36-40.
55. Gallegos-Neyra E. M., Lugo-Vásquez A., Calderón-Vega A., Sánchez-Rodríguez M del R. y Mayén-Estrada R. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 2014, 85:S10-S25.

56. Garajová M., Mrva M., Ondriska F., Ziak P. *Vermamoeba* associated keratitis-first case in Slovakia. V4 Parasitological Meeting, Slovakia, 2014, May 25-30.
57. Garaycochea M., Beltrán M., Morón C. Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima / Patogenicity of free-living amebas isolates in bodywaters from Lima. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica. 2008, 25(2):204-207.
58. García H., Chile, esencia y evolución, 1982. Instituto de Estudios Regionales de la Universidad de Chile.
59. García A., Goñi P., Cieloszyk J., Fernández M.T., Calvo-Beguería L., Rubio E., Fillat M.F., Peleato M.L. and Clavel A. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. Environ. Sci. Technol. 2013, 47:3132-3140.
60. García A., Goñi P., Clavel A., Lobez S., Fernández MT. and Ormad MP. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. Environ Microbiol Rep. 2011,3(5):622-6.
61. García-Sánchez A.M., Ariza C., Ubeda J.m., Martín-Sánchez P.M., Jurado V., Bastián F., Alabouvette C. and Saiz-Jiménez C. Free-living amoebae in sediments from the Lascaux Cave in France. International Journal of Speleology. 2013. 42 (1):9-13.
62. Gast R, Ledee D., Fuerst P. and Byers T. Subgenus Systematics of *Acanthamoeba*: Four Nuclear 18S rDNA Sequence Types. J. Euk. Microbiol. 1996, 43(6):498-504.
63. Geisen S., Fiore-Donno A.M., Walochnik J., Bonkowski M. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. Parasitol Res. 2014, 113:3151-3158.

64. Gelman BB., Popov V., Chaljub G., Nader R., Rauf SJ., Nauta HW., Visvesvara GS. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diplodea*. J. Neuropathol Exp Neurol. 2003, 62(10):990-998.
65. Gertiser M.I., Visciarelli E., Basabe N., Pérez M.J., Costamagna S.R. *Acanthamoeba* spp en piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2010, 44(4):697-703.
66. Ghadar-ghadr Sh., Solhjoo K., Norouz-nejad MJ., Rohi R, Zia-Jahromi S. Isolation and identification of free living amoeba (*Naegleria* and *Acanthamoeba*) in Shiraz water resources by morphological criteria. Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Fall. 2012, 10(3):26-33.
67. Gianinazzi Ch., Schild M., Wüthrich F., Müller N., Schürch N., Gottstein B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. Experimental Parasitology. 2009, 121:180-186.
68. Goñi P., Fernández M. T. and Rubio E. Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae. Environmental Microbiology. 2014, 16 (2): 339-349.
69. Górnik K., Kuźna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. Ann Agric Environ Med. 2004, 11:233-236.
70. Gourabathini P., Brandl M.T., Redding K.S., Gunderson J.H., and Berk S.G. Interactions between Food-Borne Pathogens and Protozoa Isolated from Lettuce and Spinach. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74(8):2518-2525.
71. Grün A-L., Stemplewitz B., Scheid P. First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. Parasitol Res. 2014, 113:2395-2400.

72. Güerri N., Alías E.G., Díaz S., Sánchez A., Brito C., Honrubia F.M. Queratopatía por *Acanthamoeba* en portadores de lentes de contacto. A propósito de tres casos. Rev. Esp. Contact. 2006, 13:67-72.
73. Gupta S., Das S.R. Stock cultures of free-living amebas: effect of temperatura on viability and pathogenicity. J Parasitol. 1999, 85(1):137-139.
74. Herskovic P. y Astorga B. Primer aislamiento de amebas de vida libre potencialmente patógenas. Parasitol. al día. 1989. 13:44. 46.
75. Hewett MK., Robinson BS., Monis PT and Saint CP. 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. 2003, 42:325-329.
76. Hoffmann R., Michel R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. Int J Hyg Environ Health. 2001. 203(3):215-219.
77. Horn M., Fritsche TR., Gautom RK., Schleifer KH., Wagner M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. Environmental Microbiology. 1999, 1(4):357-367.
78. Hsu B-M., Ma P-H., Liou T-S., Chen J-S., Shih F-Ch. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from hot spring recreation areas in the central range, Taiwan. Journal of Hydrology. 2009, 367(3-4):249-254.
79. Huang SW., Hsu BM. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. Acta Trop. 2010, 115(3): 282-7.

80. Init I., Lau YL., Fadzlan A., Foad AI., Neilson RS. And Nissapatorn V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Tropical Biomedicina*. 2010, 27(3): 566-577.
81. Instituciones de Salud Privada [www.isapre.cl](http://www.isapre.cl) (año de consulta: 2014)
82. Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). [www.ispch.cl](http://www.ispch.cl), (año de consulta: 2015)
83. Instituto Nacional de Estadística de Chile (INE). Censo 2012, [www.ine.cl](http://www.ine.cl)
84. Jeong HJ., Lee SJ, Kim JH., Xuan YH., Lee KH., Park SK., Choi SH., Chung DI., Kong HH., Ock MS., Yu HS. *Acanthamoeba*: Keratopahogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. *Experimental Parasitology*. 2007, 117: 357-367.
85. Jeong HJ. and Yu HS. The rol of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean J Parasitol*. 2005, 43(2):47-50.
86. John D.T., Howard M.J. Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res*. 1995, 81:193-201.
87. John D.T. and John R. A. Viability of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* isolates during 10 years of cryopreservation. *Folia parasitologica*. 2006, 53: 311-312.
88. Kao PM, Hsu BM, Chen NH, Huang KH, Huang SW, King KL, Chiu YC. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan. *Exp Parasitol*. 2012, 130(4):354-8.
89. Kao PM, Tung MCh, Hsu BM, Tsai HL, She CY, Shen SM, Huang WC. Real-time PCR method for the detection and quantification of *Acanthamoeba* species in various types of water samples. *Parasitol Res*. 2013, 112:1131-1136.

90. Khan N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006, 30: 564-595.
91. Khanna V., Shastri B.A., Anusha G., Mukhopadhyay Ch., Khanna R. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literatura. Trop Parasitol. 2014, 4(2):115-118.
92. Kilvington S., Gray T., Dart J., Morlet N., Beeching JR., Frazer DG and Mtheson M. *Acanthamoeba* keratitis: The Rol of Domestic Tap Water contamination in the United Kingdom IOVS. 2004, 45(1).
93. Kiss C., Barna Z., Vargha M., Török JK. Incidence and molecular diversity of *Acanthamoeba* species isolated from public baths in Hungary. Parasitol Res. 2014, 113(7):2551-2557.
94. Kyle D.E., and Noblet G.P. Seasonal Distribution of Thermotolerant Free-Living Amoebae. I. Willard's Pond J. Protozool. 1986, 33(3).
95. Laconte M.L., Rivero F., Luján H., Casero R. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de amebas de vida libre (*Acanthamoeba*) obtenidas del medio ambiente y de pacientes con queratitis amebiana. [www.cobico.com.ar/wp-content/archivos/2013/07](http://www.cobico.com.ar/wp-content/archivos/2013/07) (fecha de consulta: 2014)
96. Lakhundi S., Khan NA., Siddiqui R. Inefficacy of marketed contact lens disinfection solutions against heratitis-causing *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. Experimental Parasitology. 2014, 141:122-128.
97. Lamoth F. & Greub G. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. FEMS Microbial Rev. 2010, 34:260-280.
98. Lares F., Ayala I., Verdugo E. Amibas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. ITSON-DIEP VOL. III. 2001, 10:39-47.

99. Lares-Jiménez L.F., Lares-Villa F. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 2009, 5 (2):161-167.
100. Lass A., Szostakowska B., Idzińska A., Chomicz L. The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated from natural water reservoirs in Poland. *Parasitol Res*. 2014, 113:2693-2699.
101. Lau H.Y. and Ashbolt N.J. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol*. 2009, 107:368-378.
102. Laummaunwai P., Ruangjirachuporn W., Boonmars T. A simple PCR condition for detection of a single cyst of *Acanthamoeba* species. *Parasitol Res*. Published online: 12 October 2011. DOI: 10.1007/s00436-011-2662-3.
103. Legarreta J.E., Nau A.C., Dhaliwal DK. *Acanthamoeba* keratitis associated with tap water use during contact lens cleaning: Manufacturer Guidelines Need to Change. *Eye Contact Lens*. 2013, 39(2):158-161.
104. Leiva B., Clasdóttir E., Linder E & Winiecka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. Amebae in water sources of Leon, Nicaragua. *Rev.Bio.Trop*. 2008, 56(2):439-446.
105. Li-Li Chan., Joon-Wah Mak., Yoon-Tong Low., Thuan-Tzen Koh., Init Ithoi and Shar Mariam Mohamed Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica*. 2011, 117:23-30.
106. Lorenzo-Morales J., Khan NA. and Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015, 22:1-20.

107. Lorenzo-Morales J., Lindo JF, Martinez E., Calder D., Figueruelo E., Valladares B., Ortega-Rivas A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005, 99(8):751-8.
108. Lorenzo-Morales J., López-Darias M., Martínez-Carretero E., Valladares B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. *Exp Parasitol*. 2007, 117(1):74-79.
109. Lorenzo-Morales J. and Maciver S. K. Long-term, low-maintenance storage of *Acanthamoeba* strains. *Parasitol Res*. 2006, 99(6):743-5.
110. Lorenzo-Morales J., Martínez-Carretero E., Batista N., Álvarez-Marín J., Bahaya Y., Walochnik J., Valladares B. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res*. 2007a, 102:167-169.
111. Lorenzo Morales J., Monteverde-Miranda C.A., Jiménez C., Tejedor M.L., Valladares B., Ortega-Rivas A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med*. 2005, 12: 233-236.
112. Lorenzo-Morales J., Morcillo-Laiz R., Martín-Navarro C.M., López-Vélez R., López-Arencibia A., Arnalich-Montiel F., Maciver SK., Valladares B., Martínez-Carretero E. *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain. *Contact Lens & Anterior Eye*. 2011, 34(2):83-6.
113. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res*. 2005, 95(4): 273-277.

114. Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Martínez E., Khoubbane M., Artigas P., Periago MV., Foronda P., Abreu-Acosta N., Valladares B., Mas-Coma S. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Trop.* 2006, 100(1-2):63-69.
115. Luzio W., Casanova M. *Avances en el conocimiento de los suelos de Chile.* 2006. Universidad de Chile.
116. Maciver SK., Asif M., Simmen M. W., Lorenzo-Morales J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *European Journal of Protistology.* 2013, 9:217-221.
117. Madrigal-Sesma M.J., Contreras-Ferrandiz M., Martínez-Grueiro M. Aislamiento, identificación y patogenia de amebas de vida libre en aguas de consumo de Madrid. *Rev. Ibér. Parasitol.* 1986, 46 (3):219-221.
118. Magnet A, Fenoy S., Galván AL., Izquierdo F., Rueda C., Fernández Vadillo C., A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res.* 2013, 47(19):6966-6972.
119. Magnet A., Galván A.L., Fenoy S., Izquierdo F., Rueda C., Fernández Vadillo C., Pérez-Irezábal J., Bandyopadhyay K., Visvesvara G.S., da Silva A.J. , del Águila C. Molecular Characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res.* 2012, 111:383-392.
120. Magnet A., Henriques-Gil N., Galván-Díaz A.L., Izquierdo F., Fenoy S., del Águila C., Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res.* 2014, 113:2845-2850.
121. Marciano-Cabral F. and Cabral Guy. *Acanthamoeba* spp as Agents of Disease in Humans. *Clinica Microbiology Reviews.* 2003, 16:273-307.

122. Marciano-Cabral F., Jamerson M. and Kaneshiro ES. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of Water and Health*. 2010, 08(1):71-82.
123. Mario JM., Vaerewijck M., Sabbe K., Baré J., Houf K., Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 147(2):105-111.
124. Maschio VJ., Chies F., Carlesso AM., Carvalho A., Rosa SP., Van Der Sand ST., Rott MB. *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 Isolated from Mineral Water Bottles in Southern Brazil. , 2015. 70(1):6-9.
125. Matin A., Siddiqui R., Jayasekera S. and Khan NA. Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, 21(3):435-448.
126. Mazur T., Hadas E., Iwanicke I. The duration of the cysts and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol*. 1995, 46:106-108.
127. Ministerio de Salud de Chile. [www.minsal.cl](http://www.minsal.cl). (Fecha de consulta: 2014)
128. Mirjalali H., Niyayati M., Abedkhozasteh H., Babei Z., Sharifdini M. Rezaeian M. Pathogenic Assays of *Acanthamoeba* Belonging to the T4 Genotype. *Iranian J Parasitol*. 2013, 8(4):530-535.
129. Mohanna S., Bravo F. Lesiones centro-faciales en dermatología. *Folia Dermatol*. 2006, 17(3):151-154.
130. Montalbano M., Santoro M., Lovreglio P., Monno R., Capolongo C., Calia C., Fumarola L., D' Alfonso R., Berrilli F. and Di Cave D. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2015, 12: 3417-3427.

131. Mosayebi M., Ghorbanzadeh B., Eslamirad Z., Ejtehadifar M., Rastad B. The isolation and Detection of *Acanthamoeba* Keratitis in Rural Water Sources of Arak, Iran. MLJ. 2013, 7(4):66-71.
132. Muchesa P., Mwamba O., Barnard T.G. and Bartie C. Detection of Free-Living Amoebae Using Amoebal Enrichment in a Wastewater Treatment Plant of Gauteng Province, South Africa. BioMed Research International Volume 2014, Article ID 575297, 10 pages. dx.doi.org/10.1155/2014/575297.
133. Muñoz V., Reyes H., Astorga B., Rugiero P., del Río S., Toche P. Amebas de Vida Libre en habitats de aguas dulces de Chile. Parasitol al Día. 1993. 17:147-152.
134. Nacapunchai D., Kino H., Ruangsitticha C., Sriwichai P. Ishih A., Terada M., Ruangsitticha C., Sriwichai P., Ishih., Terada M. A brief survey of free-living amoebae in Thailandad Hamamatsu District, Japan. Southeast Asian. J. Trop Med Public Health. 2001, 32(2):179-182.
135. Napolitano J. Isolation of Amoebae from Edible mushrooms. Applied and Environmental Microbiology. 1982. 44(1): 255-257.
136. Napolitano J. and Colletti-Eggolt C., Occurrence of Amoebae on Oak leaf lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) and Boston lettuce (*L. sativa* var. *capitata*). J. Protozool. 1984, 31(3):454-455.
137. National Standard Method W17 Issue 2. Health Protection Agency (2004). Isolation and identification of *Acanthamoeba* species. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdfsops.asp>. Fecha de consulta: 2009
138. Navarro J., Zarco D., Lorduy L., Alemán A. Queratitis por *Acanthamoeba*: a propósito de un caso bilateral. Farm Hosp. 1998, 22(5):253-255.

139. Nazar M., Haghghi A., Niyati M., Eftekhar M., Tahvildar-biderouni F., Taghipour N., Abadi A., Nazemalhosseini Mojarad E. and Athari A. Genotyping of *Acanthamoeba* isolated from water in recreational areas of Tehran, Iran. *J Water Health*. 2011. 9(3):603-608.
140. Niyati M., Lasgerdi Z. and Lorenzo-Morales J. Detection and molecular characterization of potentially pathogenic free-living amoebae from water sources in Kish Island, Southern Iran. *Microbiology Insights*. 2015, 8(S1): 1-6.
141. Niyati M., Lorenzo-Morales J., Rezaie S., Rahimi F., Mohebbi M., Maghsood A.H., Motevalli-Haghi A., Martín-Navarro C.M., Farnia S., Valladares B., Rezaeian M. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Experimental Parasitology*. 2009, 121: 242-245.
142. Norma Mexicana NMX-AA-132-SCF 1-2006. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides y manejo de la muestra.
143. Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010. Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas.
144. Nuprasert W., Putaporntip C., Pariyakanok L. and Jongwutiwes. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. *J. Clin. Microbiol*. 2010, 48(12):4636-4640.
145. Nwachuku N., Schoeny R., Visvesvara G., Moura H., Martínez J., Jakubowski W., Alizadeh H., Niederkorn J. Health effects support document for *Acanthamoeba*. EPA-822-03-012. May 2003.
146. Oddó D., Ciani S y Vial P. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*. Primer caso diagnosticado en Chile. *Rev Chil Infect*. 2006, 23 (3): 232-236.

147. Orosz E., Farkas A., Ködöböcz L., Becságh P., Danka J., Kucsera I., Füleky G. Isolation of *Acanthamoeba* from the rhizosphere of maize and lucerne plants. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60(1):29-39.
148. Ortiz R., Bonilla P., Monsalvo A. y Eslava C. Detección de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* por PCR en cuerpos de agua recreativos en el Estado de San Luis de Potosí, México. *BIOCYT, FES Iztacala, UNAM.* 2012, 5(19):358-365.
149. Otta DA., Rott MB., Carlesso AM., da Silva OS. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012, 111:2017-2022.
150. Ózçelik S., Açikalin K., Yünlü Ö., Alim A., Malatyali E. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Turkiye Parazitol Derg.* 2012, 36:198-203.
151. Ozkoc S., Tuncay S., Bayram Delibas S., Akisu C., Ozbek Z., Durak I. and Walochnik J. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkamfia* sp. from two clinical samples. *J Med Microbiol.* 2008, 57:392-396.
152. Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf.* 2010, 8(2): 70-79
153. Parija SC., Dinoop KP and Venugopal H. Management of granulomatous amebic encephalitis: Laboratory diagnosis and treatment. *Trop Parasitol.* 2015, 5(1):23-28
154. Pasricha G., Sharma S., Garg P. and Aggarwal RK. Use of 18S rRNA Gene-Based PCR Assay for Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis in Non-Contact Len Wearers in India. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:( 7) 3206-3211.

155. Petit F., Vilchez V., Torres G., Molina O., Dorfman S., Mora E., Cardozo J. Meningoencefalitis Amebiana Primaria. Comunicación de dos nuevos casos Venezolanos. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006, 64(4):1043-1046.
156. Petry F., Torzewski M., Bohl J., Wilhelm-Schwenkmezger T., Scheid P., Walochnik J., Michel R., Zöller L., Werhahn K., Bhakdi S. and Lackner K. Case Reports. Early Diagnosis of *Acanthamoeba* Infection during Routine Cytological Examination of Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006, 44(5):1903-1904.
157. Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Índice de Desarrollo Humano (IDH). 2014. [www.pnud.cl](http://www.pnud.cl)
158. Pussard M & Pons R Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (protozoa, Amoebida) *Protistologica.* 1977, 13:557-610.
159. Qvarnstrom Y., da Silva AJ., Schuster FL., Gelman BB. and Visvesvara GS. Molecular Confirmation of *Sappinia pedata* as Causative Agent of Amoebic Encephalitis. *Brief Report JID.* 2009, 199:1139-1142.
160. Qvarnstrom Y., Thomas NA. & Govinda V. Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2013, 60:626-633.
161. Qvarnstrom Y., Visvesvara G.S., Sriram R. and da Silva A.J. Multiple Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44(10):3589. DOI: 10.1128/JCM.00875-06.
162. Rahdar M., Niyati M., Salehi M., Fegghi M., Makvandi M., Pourmehdi M., Farnia S. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* Strains from Environmental

Sources in Ahvaz City, Khuzestan Province, Southern, Iran. *Iranian J Parasitol.* 2012, 7(4):22-26.

163. Ramírez Molas L., Kang H., Ayala Lugo R., Fariña N., Sanabria R., Miño de Kaspar H. Queratitis por *Acanthamoeba* sp. Reporte de caso. *An. Fac. Cienc. Méd.* 2005, 38(3):44-47.

164. Ramírez E, Robles E, Martínez B, Ayala R, Sainz G, Martínez ME, Gonzalez ME Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Exp Parasitol.* 2014, 145 Suppl:S34-8.

165. Ramírez E., Valderrama R., Ayala., Rodríguez B. Calidad amebótica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el Estado de Hidalgo. *Ingeniería.* 2012, 16(3):219-228.

166. Retana-Moreira L., Abrahams-Sandí E., Castro-Artavia E., Fernández-Sánchez A., Castro-Castillo A., Reyes-Batlle M., Lorenzo-Morales J. Isolation and Molecular Characterization of *Acanthamoeba* Strains from Dental Units in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol.* 2015, 6216:733-736.

167. Reyes-Batlle M., Todd Ch.D., Martín Navarro C.M., López-Arencia A., Cabello-Vílchez A. M., González A.C., Córdoba-Lanús E., Lindo J. E., Valladares B., Piñero J. E., Lorenzo-Morales J. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res.* 2014.,113:1383-1388.

168. Rezaeian M., Niyati M., Farma S. Isolation of *Acanthamoeba* spp from Different Environmental sources. *Irian J. Parasitol.* 2008, 3(1):44-47.

169. Rivera F., Lares F., Gallegos E., Ramirez E., Bonilla P., Calderon A., Martinez JJ., Rodriguez S., Alcocer J. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ Res.* 1989, 50(2):289-295.

170. Rodríguez-Zaragoza S., Mayzlish E. and Steinberger Y. Vertical Distribution of the Free-Living Amoeba Population in Soil under Desert Shrubs in the Negev Desert, Israel. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71(4) 2053-2060.
171. Rodríguez-Zaragoza S., Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Gallegos E., Calderón A., Ortiz R., Hernández D. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosi, SLP. Mexico. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 1993, 3 (Suppl 1):229-41.
172. Rowbotham T. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 1980, 33:1179-1183.
173. Salazar H., Moura H., Ramos R. Isolamento de amebas de vida livre a partir de agua mineral engarrafada. *Rev. Saúde Públ.* 1982, 16:261-7.
174. Sawyer Thomas K, Free-Living Pathogenic and Nonpathogenic amoebae in Maryland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(5):1074-1077.
175. Scheid PL, Schwarzenberger R. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitol Res.* 2011, 109(2):499-504.
176. Schlessinger S., Fratkin J., Todaro M., Henderson H., Seawright A., Parker C., Byers P. *Balamuthia mandrillaris* Transmitted Through Organ Transplantation. *MMWR.* 2010, 59(36):1165-1170.
177. Schroder JM., Booton GC., Hay J, Niszl IA., Seal DV., Markus MB., Fuerst PA., and Byers TJ. Use of Subgenic 18S 317. Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Human with Keratitis and from Sewage Sludge. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001, 39(5):1903-1911.
178. Schuster F., De Jonckheere J.F., Moura H., Sriram R., Garner M.M. and Visvesvara G.S. Isolation of a Thermotolerant *Paravahlkampfia* sp. From Lizard Intestine: Biology and Molecular Identification. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2003, 50(5):373-378.

179. Schuster F., Glaser C., Honarmand S., Maguirre JH. and Visvesvara GS. *Balamuthia* Amebic Encephalitis risk, Hispanic Americans. Emerging Infectious Diseases. 2004, 10(8):1510-1512.
180. Schuster F., Visvesvara G. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. 2004, 34:1001-1027.
181. Shanan S., Abd H., Bayoumi M., Saeed A., and Sandström G. Prevalence of protozoa species in drinking and environmental water sources in Sudan. BioMed Research International. 2015, Article ID 345619, 5 pages. [dx.doi.org/10.1155/2015/345619](https://doi.org/10.1155/2015/345619)
182. Shanan S., Abd H., Hedenström I., Saeed A. and Sanström G. Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from differen cholera endemic areas in Sudan. BMC Research Notes 2011, 4:109. [www.biomedcentral.com/1756-0500/4/109](http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/109)
183. Siddiqui R. and Khan N.A. Review Biology and Pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites & Vectors, 2012, 5:6.
184. Siddiqui R. and Khan NA. *Balamuthia mandrillaris*: Morphology, biology and virulence. Trop Parasitol. 2015, 5(1): 15-22.
185. Smirnov A., Chao E., Nassonova E. and Cavalier-Smith T. A revised classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: lobosa). Protist. 2011, 162:545-570.
186. Solgi R., Niyati M., Haghghi A., Taghipour N., Javad S., Tabaei S. Eftekhar M. and Nazemalhosseini E. Thermotolerant *Acanthamoeba* spp. isolated from therapeutic hot springs in northwestern Iran. Journal of Water and Health. 2012, 10.4.
187. Standard Method for the examination of water and wastewater, 9711C. 21<sup>st</sup> Edition, 2005.

188. Steinberg J.P., Galindo R.L., Kraus E.S., and Ghanem K.G. Disseminated Acanthamebiasis in a Renal Transplant Recipient with Osteomyelitis and Cutaneous Lesions: Case Report and Literature Review. *CID* 2002, 35:43-49 (Clinical Infectious Diseases).
189. Stothard D.R., Schroeder-Diedrich J. M., Awwad M.H., Gast R.J., Ledee D. R., Rodríguez-Zaragoza S., Dean Ch.L., Fuerst P.A. and Byers T. J. The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types. *J. Euk. Microbiol.* 1998, 45(1): 45-54.
190. Suárez R., Espinoza Y., Villanueva C., Ramos J., Huapaya P., Marquina R. Aislamiento de amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* a partir de fuentes de agua en la ciudad de Ica. *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 2002, 63(2):101-105.
191. Tanveer T., Hameed A., Muazzam A. G., Jung S-Y., Gul A., Matin A. Isolation and molecular Characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotypes from diverse water resources including household drinking water from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Parasitol Res.* 2013 112:2925-2932.
192. Thomas V., McDonnell G., Denyer S. and Maillard J-Y. Free living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews.* 2010, 34(2):231-259.
193. Tilak R., Sing R.G., Wani I.A., Parekh A., Prakash J, and Usha. An unusual case of *Acanthamoeba* peritonitis in a malnourished patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *J. Infect Developing Countries.* 2008, 2(2):146-148.
194. Todd Ch., Reyes-Batlle M., Martín-Navarro C.M., Dorta-Gorrín A., López-Arancibia A., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Valladares B., Lindo J.F. & Lorenzo-Morales J. Isolation and Genotyping of *Acanthamoeba* Strains from Soil Sources from Jamaica, West Indies. *J. Eukaryotic Microbiol.* 2015, 62(3):416-421.

195. Tovar O. 2006. Tesis “Aislamiento e identificación de AVL en el sistema de agua del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” y su interacción con *Legionella pneumophila*”. Universidad de Zaragoza
196. Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Sellami H., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F., .Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol.* 2012, 60(6):399-405.
197. Trabelsi H., Sellami A., Dendana F., Sellami H., Cheikh-Rouhou F., Makni F., Ben Dhiaa S & Ayadi A. Free-Living Amoeba (FLA): Morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite.* 2010, 17: 67-70.
198. Tzeng K., Hsu B., Tsai H., Huang P., Tsai J., Kao P., Huang K., Chen J. Detection and identification of free-living amoeba from aquatic environment in different seasons in Taiwan. American Geophysical Union, Fall Meeting 2013, abstract #H51N-1390
199. Valencia LA, 2012. Tesis Máster “Estudio de Amebas de Vida Libre en verduras crudas en Tenerife, Islas Canarias, España”.
200. Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. *Hand Clin Neurol.* 2013, 114:153-168.
201. Visvesvara G.S., Moura H. & Schuster FL. Minireview Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007, 50:1-26.
202. Visvesvara G., Sriram R., Qvarnstrom Y., Bandyopadhyay K., Da Silva AJ., Pieniazek NJ. And Cabral GA. *Paravahlkampfia francinae* n.sp. Masquerading as an Agent of Primary Amoebic Meningoencephalitis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2009,56(4):357-366.

203. Walia R., Montoya JG., Visvesvara GS., Booton GC., Doyle RL. A case of successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba* infection in a lung transplant recipient. *Transplant Infectious Disease*. 2007, 9: 51-54
204. Walochnik J., Obwaller A., Aspöck H. Correlation between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(10):4408-4413.
205. Walochnik J., Scheikl U. and Haller-Schober E-M. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2015, 62: 3-11
206. Wannasan A., Uparanukraw P., Songsangchun A., Morakote N. Potentially pathogenic free-living amoebae in some flood-affected areas during 2011 Chiang Mai Flood. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2013, 55(6):411-416.
207. Wheat W.H., Casali A.L., Thomas V., Spencer J.S., Lahiri R., Williams D.L., McDonnell G.E., González-Juarrero M., Brennan P.J., Jackson M. Long-term Survival and Virulence of *Mycobacterium leprae* in Amoebal Cysts. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014, 8(12): e3405.
208. Winiecka-Krusnell J., Dellacasa-Lindberg I., Dubey JP., Barragan A. *Toxoplasma gondii*: uptake and survival of oocysts in free-living amoebae. *Exp Parasitol*. 2009, 121(2):124-131.
209. Winiecka-Krusnell J., Wreiber K., Von Euler A., Engstrand L., Linder E. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis*. 2002. 34(4):253-256.
210. Wylezich C., Walochnik J., Michel R. High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations. *Parasitol Res*. 2009, 105:869-873.

211. Zbang Y., Sun X., Wang Z., Li R., Luo S., Jin X., Deng S. and Chen W. Identification of 18S Ribosomal DNA Genotype of *Acanthamoeba* from Patients with Keratitis in North China. IOVS. 2004, 45(6):1904-1907.