

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



**TESIS DOCTORAL**

**Epidemiología y diagnóstico de amebas de vida libre implicadas en salud humana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ángela Magnet Dávila**

Directoras

Carmen del Águila de la Puente  
Soledad Fenoy Rodríguez

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



# EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE IMPLICADAS EN SALUD HUMANA

Tesis Doctoral

Ángela Magnet Dávila

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU  
FACULTAD DE FARMACIA





**Universidad San Pablo-CEU**

**Facultad de Farmacia**

CARMEN DEL ÁGUILA DE LA PUENTE, Profesora Catedrática y SOLEDAD FENOY RODRÍGUEZ, Profesora Titular, de la Universidad San Pablo CEU.

**AUTORIZAN:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE IMPLICADAS EN SALUD HUMANA**" que ha sido realizada por Dña. Ángela Magnet Dávila, en el laboratorio de Parasitología de la Universidad San Pablo CEU, para optar al Grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección.

Madrid, 23 de Junio de 2014

Fdo: Dra. Carmen del Águila de la Puente

Fdo: Dra. Soledad Fenoy Rodríguez



**A MIS PADRES  
Y A MI HERMANA**



**"If we knew what we were doing, it wouldn't be called research."**

**Albert Einstein**



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que han participado de forma directa o indirectamente en la realización de esta tesis porque sin ellos no estaría, por fin, sentada terminando este manuscrito. Quiero agradecer especialmente a:

Mis directoras de Tesis, las doctoras Carmen del Águila y Marisol Fenoy por acogerme en su equipo de investigación desde “pequeñita”, por enseñarme, apoyarme y acompañarme todos estos años. Por ser amigas.

A compañeros pero sobre todo amigos del laboratorio; a Fernando por nuestros días al sol de planta en planta y de embalse en embalse, porque perdí el palo-palito; a Sergio por enseñarme a cuidar “bichitos”; a Ana Luz por ser mi amiga y compañera de fatigas, por nuestros paseos; a Carmencita porque “last night a DJ saved *our* life”; a Loli por nuestra conexión telemática, por soportar mi caos en nuestra mesa; a Carola por nuestras discusiones de pelos de locas; a Lucianna por su dulzura latina; a Thiago por todas las lentillas que miramos con aburrimiento, por ser mi compañero de viajes y a todas las “niñas” que han pasado por el laboratorio estos últimos años: Pamela, Patricia, Pilar y Javi. A nuestras estudiantes de pregrado Natalia y Soraya porque prácticamente hemos crecido juntas.

A mis vecinos de laboratorio: a Julio por nuestras discusiones estadísticamente sesudas; a María Limones por “hacerme las gafas”; a María Haro por nuestros desayunos, comidas, cenas...; a Angélica por ser Mami; a Anne por nuestras risas; a los “vegetales” Dani, Cherry, Elena y Lucía por los momentos que compartimos.

A Nuno por enseñarme de genética, de secuencias, de arbolitos, por revisarme los manuscritos.

A mis amigos: Ana, María, Zaira, Julián, Vero, Jesús, Susana, Maricarmen, Jorge, Mayi y Cris por ser como sois, por estar ahí, por nuestros viajes, excursiones y barbacoas.

A Fran porque ha sido mi apoyo gráfico desde que empecé la tesis, por tus increíbles videos, por ser capaz de poner movimiento a mis ideas, por leerte esta tesis.

To my international friends: Becky and Claudio for being family to me; Carmen and Alex for our TV afternoons; Shera, Mary Kate and Betsy for your company in Atlanta, Janny and Anna Lissa for letting me be part of your family, Sara for being my American-Spanish-Afghan friend, for our trivia nights, Brian for reading and reading and correcting my drafts.

To all CDC staff for teaching me tons of things, for inviting me twice, but on top of everything, for being my friends: Alex, Vish, Norman and Danka, Yvonne, Kakali, Rama and Marcos, thank you, thank you to all of you.

A mis padres y a mi hermana, por aguantarme y soportar mi cara de mal genio, por apoyarme siempre. A mi familia: a mis abuelos que estarían muy orgullosos de mí, a mis abuelas, primos, tíos, por interesaros siempre por cómo iba la tesis.

A la Fundación San Pablo CEU, al Ministerio de Educación y al Banco de Santander por sus respectivas becas.

Y a todos aquellos que me he dejado en el tintero.

¡GRACIAS!

## ÍNDICE

Índice .....	VII
Índice de tablas .....	X
Índice de figuras.....	X
Resumen.....	XIII
Abstract .....	XV
1. Introducción .....	1
1.1. Introducción .....	3
1.2. Taxonomía y biología de <i>Acanthamoeba</i> .....	4
1.2.1. Descubrimiento de <i>Acanthamoeba</i> .....	4
1.2.2. Filogenia.....	6
1.2.3. Morfología .....	8
1.2.4. Clasificación y genotipado .....	10
1.2.5. Organización genómica nuclear .....	18
1.2.6. Organización genómica mitocondrial .....	20
1.2.7. Ciclo biológico. ....	23
1.2.7.1. Cultivo en el laboratorio. ....	24
1.3. Distribución.....	26
1.4. Infecciones, patogenia y tratamiento.....	31
1.4.1. Queratitis amebiana .....	33
1.4.1.1. Factores de riesgo.....	36
1.4.1.2. Tratamiento.....	36
1.4.2. Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA).....	38
1.4.2.1. Factores de riesgo.....	41
1.4.2.2. Tratamiento.....	41

1.4.3.	Acanthamebiasis cutánea .....	42
1.4.3.1.	Tratamiento.....	44
1.4.4.	Inmunología.....	44
1.4.4.1.	Sistema del complemento .....	45
1.4.4.2.	Respuesta humoral .....	46
1.4.4.3.	Interacción <i>Acanthamoeba</i> - células del sistema inmune.....	47
1.4.5.	Diagnóstico.....	49
1.4.5.1.	Encefalitis Granulomatosa Amebiana.....	49
1.4.5.2.	Queratitis amebiana.....	50
1.5.	<i>Acanthamoeba</i> : caballo de Troya .....	51
1.5.1.	Interacción <i>Acanthamoeba</i> -bacterias .....	51
1.5.1.1.	Interacción <i>Acanthamoeba</i> – <i>Legionella</i> .....	54
1.5.2.	Interacción <i>Acanthamoeba</i> -protozoos.....	57
1.5.3.	Interacción <i>Acanthamoeba</i> -hongos.....	57
1.5.4.	Interacción <i>Acanthamoeba</i> -virus.....	58
1.6.	Planteamiento y justificación del trabajo .....	60
2.	Objetivos .....	61
2.1	Objetivo general.....	63
2.2	Objetivos específicos.....	63
3.	Estudios experimentales.....	65
3.1	Estudio 1: Molecular characterization of <i>Acanthamoeba</i> isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates.....	67
	Resumen.....	69
3.2	Estudio 2: A year long study of the presence of free living amoeba in Spain.....	81
	Resumen.....	83

3.3 Estudio 3: Vectorial potential of <i>Acanthamoeba</i> in <i>Legionella</i> propagation in water for human use.....	93
Resumen.....	95
3.4 Estudio 4: Novel <i>Acanthamoeba</i> 18S rRNA Gene Sequence Type from an Environmental Isolate. ....	119
Resumen.....	121
3.5 Estudio 5: Hemiparesia izquierda en un paciente diabético: encefalitis granulomatosa crónica por <i>Acanthamoeba</i> .....	133
Resumen.....	135
4. Discusión .....	139
4.1 Distribución de <i>Acanthamoeba</i> y otras amebas de vida libre en muestras ambientales en España .....	141
4.2 Caracterización molecular y de patogenicidad de <i>Acanthamoeba</i> en muestras ambientales de la zona centro de España y en muestras clínicas...	143
4.3 Interacción de <i>Acanthamoeba</i> y <i>Legionella</i> en el medio ambiente....	147
4.4 Utilidad del co-cultivo con <i>Acanthamoeba</i> para el aislamiento de <i>Legionella</i> en muestras ambientales .....	148
Conclusiones.....	153
Bibliografía .....	157

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de las diferentes especies de <i>Acanthamoeba</i> Grupo II según Pussard y Pons (1977).....	12
Tabla 2. Características generales de las diferentes especies de <i>Acanthamoeba</i> Grupo III según Pussard y Pons (1977). NR: no representativo. 15	
Tabla 3. Genes identificados en el ADN mitocondrial de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	22
Tabla 4. Algunos ejemplos de <i>Acanthamoeba</i> en diferentes muestras ambientales. ....	29
Tabla 5. Comparación de la infecciones producidas por las principales amebas de vida libre patógenas para el hombre. ....	32
Tabla 6. Casos de Acanthamebiasis cutánea mal diagnosticados. ....	43
Tabla 7. Ejemplos de bacterias endosimbiontes de <i>Acanthamoeba</i> . ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicaciones recogidas en PubMed desde 1933 hasta 2014 relativas a <i>Acanthamoeba</i> . ....	5
Figura 2. Árbol monofilogenético del reino Protista, subreino Protozoa. ....	7
Figura 3. Árbol filogenético.....	7
Figura 4. Trofozoitos de <i>Acanthamoeba</i> USP-GM-A3 en cultivo axénico. ....	9
Figura 5. Quistes de <i>Acanthamoeba</i> USP- A45-CR5. ....	9
Figura 6. Algoritmo para la clasificación de <i>Acanthamoeba</i> dentro de los tres grupos morfológicos descritos por Pussard y Pons (1977). ....	11
Figura 7. Algoritmo para la clasificación dentro del grupo I de Pussard y Pons (1977). ....	11
Figura 8. Esquema de la distribución de las 12 regiones variables del gen de la subunidad 18S del ARNr. ....	17
Figura 9. Composición del genoma de <i>Acanthamoeba</i> según la similitud de secuencias. ....	20
Figura 10. Ciclo biológico de <i>Acanthamoeba</i> sp. ....	24
Figura 11. Anatomía del ojo humano. ....	35
Figura 12. Histología de la córnea. ....	35

Figura 13. Observación de la córnea con una lámpara de hendidura o biomicroscopio.....	35
Figura 14. Encefalitis Granulomatosa Amebiana por <i>Acanthamoeba</i> .....	40
Figura 15. Acanthamebiasis cutánea.....	42
Figura 16. Imágenes de microscopía confocal <i>in vivo</i> (×500) de un caso de QA. .....	51
Figura 17. Fotografías de microscopía de transmisión electrónica de la fagocitosis por enrollamiento de <i>Legionella pneumophila</i> por <i>Hartmannella vermiformis</i> y <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	55
Figura 18. <i>Acanthamoeba</i> como "Caballo de Troya" . .....	56
Figura 19. Interacción de <i>Acanthamoeba</i> con hongos y protozoos. ....	57
Figura 20. <i>Acanthamoeba</i> infectada por mimivirus.....	59



## RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) como *Acanthamoeba* o *Balamuthia mandrillaris* están consideradas como patógenos emergentes humanos. Estos protozoos tienen formas de resistencia que pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo en el ambiente y particularmente en el agua por lo que la transmisión hídrica de los mismos juega un papel fundamental en su epidemiología. En los últimos años el papel de *Acanthamoeba* como vector de otros patógenos, virus, bacterias o incluso protozoos ha hecho que el interés por su epidemiología y caracterización haya aumentado. Aun así, en España, los datos relativos a la epidemiología de estas AVL en aguas destinadas al uso humano (consumo o recreo) son escasos, y se centran fundamentalmente en las Islas Canarias y en el noreste peninsular. Son aún más escasos los datos sobre la interacción de *Legionella* con *Acanthamoeba* en España. Esta falta de información va íntimamente ligada a la ausencia de legislación relativa a la calidad sanitaria del agua en relación con las AVL.

Por todo ello y con el objetivo de contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular de las AVL, especialmente de *Acanthamoeba*, se realizó un estudio sobre la presencia de estos protozoos en aguas potables y residuales procedentes de plantas de tratamiento de agua, así como de aguas superficiales y baños naturales de la Comunidad Autónoma de Madrid, además de su interacción con *Legionella* y su caracterización en muestras clínicas.

En las muestras ambientales la presencia de *Acanthamoeba* fue muy elevada independientemente del método de análisis utilizado o del tipo de agua; así, más del 90% de las muestras analizadas fueron positivas para *Acanthamoeba*. La caracterización genotípica de los diferentes aislados estudiados reveló una gran variedad de genotipos presentes en la zona centro de España, T3, T4, T11 y T19, este último descrito por primera vez. Además, la subclasificación del genotipo T4 según la secuencia de la región DF3 aumentó enormemente la variabilidad presente en la región estudiada al encontrarse 17

variantes diferentes: T4/1, T4/2, T4/8, T4/9, T4/11, T4/12, T4/13, T4/16, T4/22, T4/23, T4/24, T4/25, T4/26, T4/27, T4/28, T4/29 y T4/30. La clasificación de las secuencias DF3 se muestra como una herramienta útil para los estudios ambientales ya que permitió observar diferencias a la entrada y salida de las plantas de tratamiento estudiadas que, con los métodos morfológicos tradicionales o con la determinación del genotipo en base al 18S únicamente no habrían podido ser detectados.

Por otro lado, aunque en la descripción del tercer caso de Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) en España no pudo determinarse el genotipo de *Acanthamoeba*, en el estudio de las 44 muestras sospechosas de QA se obtuvieron 9 muestras positivas que fueron genotipadas como T4 y caracterizadas de acuerdo a la secuencia T4/DF3 como T4/9, T4/8 y T4/1. Estos genotipos coinciden con los descritos anteriormente en los aislados ambientales lo que subraya el alto contacto que existe entre el hombre y este parásito.

Así mismo, la interacción *Legionella* - *Acanthamoeba* queda patente en el alto número de aislados ambientales de *Acanthamoeba* estudiados que presentaron *Legionella* en su interior. Entre las especies de *Legionella* identificadas, *L. feeleii* es la única asociada a patología humana fundamentalmente a infecciones oportunistas, describiéndose por primera vez en muestras ambientales en España en el presente trabajo.

Además el uso de co-cultivos de *Acanthamoeba* para la detección ambiental de *Legionella* se presenta como una técnica altamente sensible en comparación con el cultivo directo del agua para la identificación de esta bacteria en agua ya que de 58 puntos estudiados, 53 fueron positivos para *Legionella* en co-cultivo y solo 4 por cultivo directo en agar.

## ABSTRACT

### “EPIDEMIOLOGY AND DIAGNOSIS OF FREE LIVING AMOEBAE INVOLVED IN HUMAN HEALTH.”

#### Introduction

Free-living amoeba (FLA) such as *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri*, are opportunistic protozoan parasites with a worldwide distribution. In the *Acanthamoeba* life cycle two states can be distinguished, the trophozoite or active form and the cyst or inactive form, which protects this protozoan when environmental conditions are adverse. In the past 10 years the interest in this organism has increased because it is the causative agent of an eye infection known as *Acanthamoeba* keratitis (AK) which can lead to blindness unless proper treatment is applied. Although less common, *Acanthamoeba* can also cause an infection in the central nervous system (CNS) in immunocompromised patients known as Granulomatous Amoebic Encephalitis (GAE). There have also been reported cases of *Acanthamoeba* pneumonia and skin infections. In addition to its pathogenicity, *Acanthamoeba* has aroused the interest of parasitologists, microbiologists and virologists because of their protective role for other microorganisms due to their symbiotic relationship and to its role as a host for various bacteria, viruses, fungi and even protozoa. This is especially important in disinfection processes because the cyst can house other pathogens, protecting them from the normal disinfection processes. In addition to this protection against external agents, *Acanthamoeba* is believed to act as a "Trojan Horse", facilitating the entry of organisms transported inside to a superior host, resulting in mixed infections.

*Acanthamoeba* has been isolated from many different types of water: sea, tap water, dental units, and bottled water among others. Despite water being essential for human living, it is also the main source of pathogen transmission. However, with population and industrial development the problem of water pollution is exacerbated by, among others, various factors that may favor the survival of organisms affecting human health. Nevertheless, the quality of water for human consumption and use is regulated in order to prevent these water-borne disease outbreaks that may be caused by viruses, bacteria and other

parasites. Notwithstanding, there are no guidelines for control of *Acanthamoeba* in water.

In Spain, data on the epidemiology of FLA in water intended for human use (consumption or recreation) are scarce and mainly focus on the Canary Islands and northeast Spain. There is even less data on the interaction of *Legionella* with *Acanthamoeba* in Spain.

Because of all of this, the aim of this work was to contribute to the knowledge of the molecular epidemiology of FLA, especially *Acanthamoeba* in environmental and clinical samples.

## **Objectives**

General objective:

- o To contribute to the knowledge of the molecular epidemiology of FLA, especially *Acanthamoeba* in environmental samples from the Autonomous Community of Madrid and clinical samples from different regions of the country.

Specific objectives:

- o To determine the presence of *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* in drinking water, sewage and surface water from the Autonomous Community of Madrid, during the period 2008-2009 and 2011.
- o To molecularly characterize *Acanthamoeba* in drinking water, sewage and surface water from the Autonomous Community of Madrid during the period 2008-2009 and 2011.
- o To determine the vector role of *Acanthamoeba* spp with regard to *Legionella* in drinking water, sewage and surface water from the Autonomous Community of Madrid.
- o To determine the usefulness of *Acanthamoeba*-*Legionella* co-culture in the recovery of *Legionella* from environmental samples.
- o To study *Acanthamoeba* as an eye and CNS pathogen in different clinical samples.

## Principal results

The current work presents the first data on the presence of the free-living amoeba (FLA), *Acanthamoeba*, *B.mandrillaris* and *N. fowleri*, in water from different Drinking Water Treatment Plants (DWTP), Waste Water Treatment Plants (WWTP), surface waters and recreational waters from central Spain. These protozoa were monitored for a year (2008-2009) to study their possible seasonality and later, in autumn and winter of 2011 to study their interaction with *Legionella*. In both periods the presence of such FLA was studied both on entry and exit of the DWTP and WWTP to evaluate the effectiveness of treatments used in those plants. The results of the annual survey revealed that the presence of *Acanthamoeba* is constant throughout the year. This lack of variability can be explained by the high resistance of this protozoan to different temperatures since it has been isolated from water at temperatures between 6°C and 42 °C and the average temperatures in Madrid range from 2.7°C to 32.1°C.

Regarding the DWTPs and WWTPs studied, the presence of *Acanthamoeba* at both entry and exit showed no differences in its presence, thus highlighting the inefficiency of current treatments in eliminating this protozoan. It is important to take into account that the cyst of this amoeba confers resistance to changes in pH, osmosis, temperature and to different concentrations of hypochlorite. The presence of *Acanthamoeba* in surface waters (lakes, reservoirs and rivers) and natural spring baths was, as in the water treatment plants, very high reaching 100% of positivity in all baths studied. Regarding the presence of *Acanthamoeba* in surface waters in the center of Spain, the values ranged from 83.3% and 95.8% of positive samples depending on the season and technique used in its detection.

Classification of *Acanthamoeba* species using the morphology of the cyst has been abandoned because it has proved to be inconsistent. Nowadays, genotyping is a more common tool used for its classification and is based on the sequence of the 18S ribosomal RNA full gene. Currently there are 18 genotypes described, appointed as T1- T18. The T4 is the genotype that is most often described in both environmental and clinical samples, so a sub-classification has been established within this genotype based on the sequence

of the hypervariable region, DF3, of the 18S rRNA gene. In our study, in the central area of Spain, T4 genotype was the most commonly detected with 17 DF3 sequence variations. Also, but less frequently, the T3, T11 and the T19 genotypes were found, being the last one described for the first time in the current study. Concerning the T4/DF3 sequences found, nine are also described for the first time in this work. With regard to the distribution of genotypes in the environment, the T3 and T11 genotypes were found exclusively in WWTPs. The T4 genotype was the most distributed, being isolated at the input and output of WWTPs and DWTP as well as from tertiary WWTP water, lakes, reservoirs, rivers and natural spring baths. When the genotypes of *Acanthamoeba* found in the input and output of the treatment plants are analyzed, it is surprising to find that the genotypes mismatch between the two points. This may be because there can be several niches within treatment plants that favor the growth of the amoebae.

*Acanthamoeba* can be described as potentially pathogenic with regard to its genotype. All genotypes found, except T19, have been previously described in clinical samples so they can be considered as potentially pathogenic for humans. Therefore an *in vivo* study with six different environmental strains was carried out to confirm their pathogenic potential. The six strains were able to establish the infection in a mice model confirming their pathogenicity. Regarding the new genotype T19, no *in vivo* assays were done because for the *in vitro* test, thermotolerance and osmotolerance, the results pointed to a nonpathogenic strain.

There are several studies in which *Acanthamoeba* and *Legionella* have been isolated from the same sampling point showing the coexistence of both pathogens in the same niche. In the current work, in addition to observing this coexistence, we studied whether environmental *Acanthamoeba* isolates have *Legionella* in their cytoplasm. For this, 51 *Acanthamoeba* strains isolated from the entrance and exit of DWTPs and WWTPs, tertiary WWTPs water and natural spring baths were analyzed. Of the 51 strains tested, 39 were shown to contain *Legionella* inside but the identification of the *Legionella* specie was possible in only two cases: *L. feeleii* and *L. falloni*. The three genotypes of *Acanthamoeba* isolated in this study, T3, T4 and T11, presented *Legionella* within as well as one

isolate from *Naegleria gruberi*. In the light of these results, it is important to keep in mind that Spain is the European country with the second highest notification rate of legionnaires' disease cases in Europe and that a high number of outbreaks are associated with reoffending sites (those in which two outbreaks of legionnaires' disease occur with at least 2 years between them). Because of this, the interaction between *Acanthamoeba* and *Legionella* may play a key role in the recurrence at sites that had apparently been disinfected for *Legionella*.

Coculture of *Acanthamoeba* and *Legionella* has been used in the diagnosis of non *L. pneumophila* cases of Legionnaires' disease and is beginning to be used in environmental studies. In our study, we obtained 53 of 58 positives for *Legionella* in cocultivation, and only 4 in agar culture which, demonstrates the usefulness of coculture in the isolation of *Legionella* in environmental samples especially in cases where the place of origin of an outbreak of Legionnaires' disease is difficult to find. Data from the European Center for Disease Control show that in only 7.4% of cases of Legionnaires' disease can the source of infection be established. Therefore, the use of coculture is shown to be an effective tool for the study of environmental *Legionella* as well as a possible tool to control Legionnaires' disease outbreaks as it allows for the identification of a greater number of foci which, in turn, may improve its elimination.

Regarding the other amoebae included in this study, *N. fowleri* could not be detected in any of the samples studied. As far as we know, there are some studies that have identified *Naegleria* in different environmental samples in Spain but, none of them could identify *N. fowleri*. In the case of *B. mandrillaris*, to date it has only been isolated from soil, sand or dust, although there have been several unsuccessful attempts to locate *B. mandrillaris* in water. In our current work, we present the first description of *B. mandrillaris* in water worldwide.

In the current work 44 samples sent for AK diagnosis were also included. From these corneal scrapings, vitreous humor, contact lenses and solution samples, we obtained nine positive results that were genotyped as T4 and characterized according to the DF3 sequence. Seven of the samples belonged

to genotype T4/9, one to T4/8 and one to T4/1. All three types have also been identified in environmental studies. This identity between clinical and environmental isolates stresses the extensive contact between man and *Acanthamoeba*.

Regarding the GAE case presented in this study, the diagnosis was made by real-time PCR in CNS biopsy and CSF although the latter tested negative. Immunofluorescence was also performed on brain slices with polyclonal anti-*Acanthamoeba* antibodies confirming the results previously obtained by PCR. The molecular characterization could not be performed so a comparison with environmental isolates was not feasible.

## Conclusions

- ✓ The presence of the human pathogenic FLA and *Legionella*, *Acanthamoeba*, *B. mandrillaris* and *L. feeleii* in different types of water from the Autonomous Community of Madrid shows water transmission as a potential health problem that is confirmed by the genotypic identification of the studied clinical isolates of *Acanthamoeba*.
- ✓ The description of the third GAE case in Spain as well as the presented AK cases suggest that avoiding contact with *Acanthamoeba* is not possible so, in the absence of an adequate removal treatment for such protozoan, good health education has been shown to be an appropriate method of prevention.
- ✓ The molecular study of *Acanthamoeba*, genotyping and genetic variability within the genotype T4, is presented as a suitable tool to be used in environmental studies as well as for the study of the efficiency of water treatment in DWTP and WWTP.
- ✓ *Acanthamoeba* and *Legionella* co-culture was established as a useful tool for the detection of *Legionella* in environmental samples.
- ✓ The vector role of *Acanthamoeba* regarding *Legionella* has been demonstrated in the central area of Spain suggesting that for there to be a complete elimination of these bacteria, appropriate antibacterial treatments as well as antiprotozoarian are necessary.

- ✓ The presence of *L. feeleii* in Spain is described for the first time as a symbiont of *Acanthamoeba* as well as a free bacterium. This is highly important as is not included in the routine diagnosis of pneumonia.



---

# INTRODUCCIÓN.



## 1.1. INTRODUCCIÓN

Especies del género *Acanthamoeba* son protozoos parásitos oportunistas con una distribución mundial. Aunque se incluyen en el grupo de Amebas de Vida Libre (AVL) pueden producir patología el hombre. En su ciclo biológico se distinguen dos estados, la forma activa o **trofozoito** que es la forma reproductora y la forma inactiva o **quiste** que brinda protección a este protozoo cuando las condiciones ambientales le son adversas. En los últimos 10 años ha aumentado el interés en este organismo debido a que es el agente causal de una infección ocular, cada día más común, conocida como queratitis por *Acanthamoeba* (QA) que puede desembocar en ceguera si no se aplica el tratamiento adecuado. Esto último no siempre es posible debido a que la clínica puede confundirse con otras infecciones. Aunque de forma menos prevalente, *Acanthamoeba* puede causar una infección en el Sistema Nervioso Central (SNC) en personas con el sistema inmune debilitado conocida como Encefalitis Granulomatosa Amebiana Crónica (EGA). También se han descrito casos de neumonía por *Acanthamoeba* e infecciones cutáneas. Además de sus capacidades patógenas, *Acanthamoeba* ha despertado el interés de parasitólogos, microbiólogos y virólogos por su papel protector de otros organismos debido a que puede establecer una relación simbiótica o ser parasitada por distintas bacterias, virus, hongos e incluso protozoos. Esto cobra especial relevancia en procesos de desinfección pues la forma quística de esta ameba puede albergar en su interior otros patógenos protegiéndolos de los procesos típicos de desinfección debido a su alta resistencia a los mismos. Además de esta protección frente a agentes externos, se considera que *Acanthamoeba* puede actuar como "Caballo de Troya" facilitando la entrada de los organismos que transporta en su interior a un hospedador superior lo que desemboca en infecciones mixtas o bacterianas secundarias a la patología protozoaria.

## 1.2. TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DE *ACANTHAMOEBA*

### 1.2.1. Descubrimiento de *Acanthamoeba*

El primer aislado de *Acanthamoeba* data de 1913 cuando Puschkarew describió en el polvo la presencia de *Amoeba polyphagus* que más tarde sería renombrada por Page como *Acanthamoeba polyphaga* (Puschkarew, 1913) (Visvesvara y col., 2007b). La segunda descripción de *Acanthamoeba* por Castellani data de 1930 cuando se descubrió como contaminante de un cultivo de *Cryptococcus paratoseus* (Castellani, 1930). Por sus características morfológicas se denominó *Hartmannella castellanii* pero un año después Volkonsky (1931) dividió el género *Hartmannella* en tres nuevos géneros: *Hartmannella*, con quistes de pared lisa; *Glaeseria* con división nuclear en el quiste; y *Acanthamoeba* con quistes con doble pared y huso cromático puntiagudo en la mitosis. Años después, se puso en duda si la clasificación de las amebas según su locomoción y quiste tenía algún valor diagnóstico y filogenético (Singh, 1952). Además, la clasificación de *Acanthamoeba* por la forma del huso cromático, no se consideró como adecuada y se anuló dicho género. En 1966, aunque Pussard (1966) aceptó que el huso cromático no era un buen carácter para definir un nuevo género, si consideró que las características del quiste de la antigua *Hartmannella castellanii* eran suficientes para volver a aceptar el género *Acanthamoeba*. Un año después, Page (1967) corroboró que la forma del huso no era una buena característica morfológica para la diferenciación de estas amebas pero que, tanto la morfología del quiste como la presencia de acantopodos eran caracteres suficientes para separar los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba*, es más, recalcó que la única característica común que compartían estos dos géneros era un patrón mitótico similar al de otras muchas amebas.

A pesar de que el descubrimiento de *Acanthamoeba* fue a comienzos del s.XX, no fue hasta la década de los años 50 cuando empezó a cobrar importancia al identificarse, cuando contaminaba un cultivo, su efecto citopático en células de riñón de mono en cultivos *in vitro* (Jahnes y Fullmer, 1957), y la capacidad para producir la muerte en animales de

laboratorio (Culbertson y col., 1958). En 1972 se diagnosticó por primera vez como el agente causal de la EGA en humanos (Jager y Stamm, 1972) y un año después como el causante de QA (Jones y col., 1975). Otro hecho que fue fundamental en el aumento de la “popularidad” de este protozoo fue el descubrimiento de bacterias endosimbiontes en su interior (Drozanski, 1956) y su capacidad para actuar como reservorio de micobacterias (Krishna-Prasad y Gupta, 1978) y *Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980). Este incremento de la atención sobre *Acanthamoeba* queda de manifiesto con el crecimiento exponencial del número de entradas en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) que aparecen cada año (Figura 1).

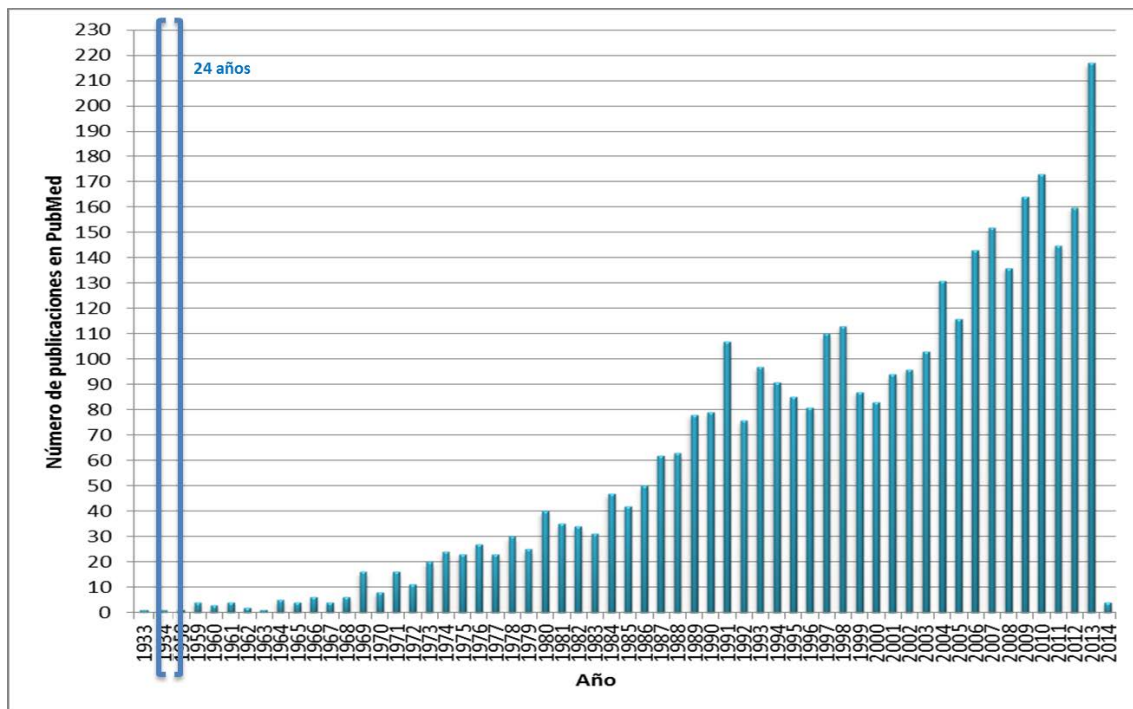
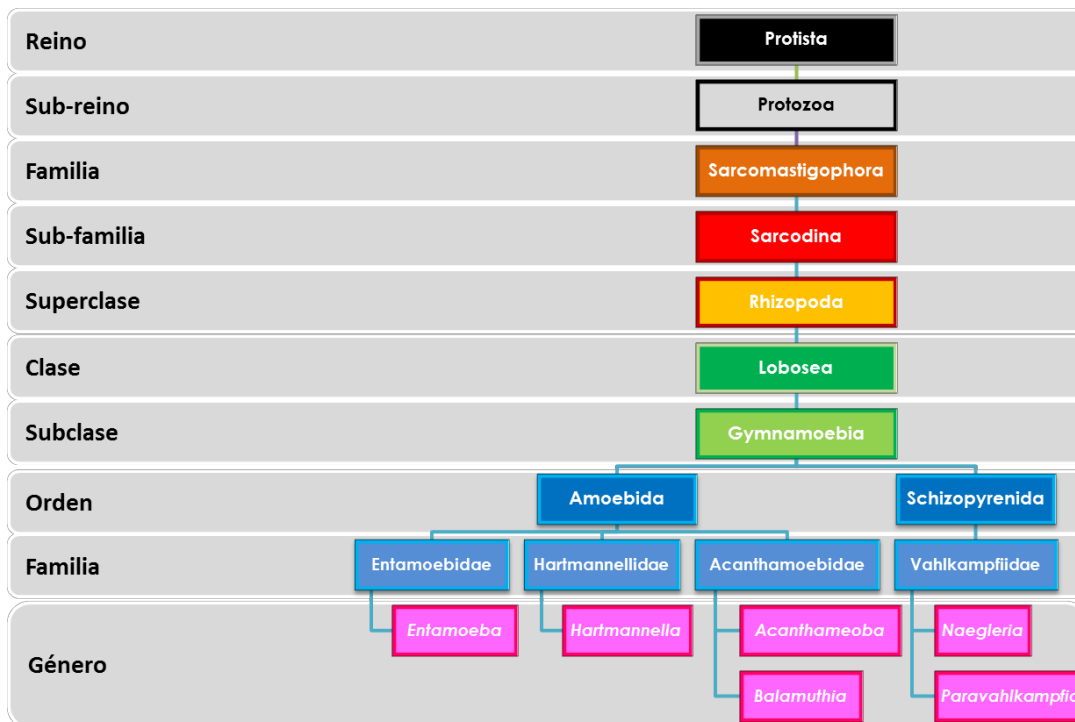


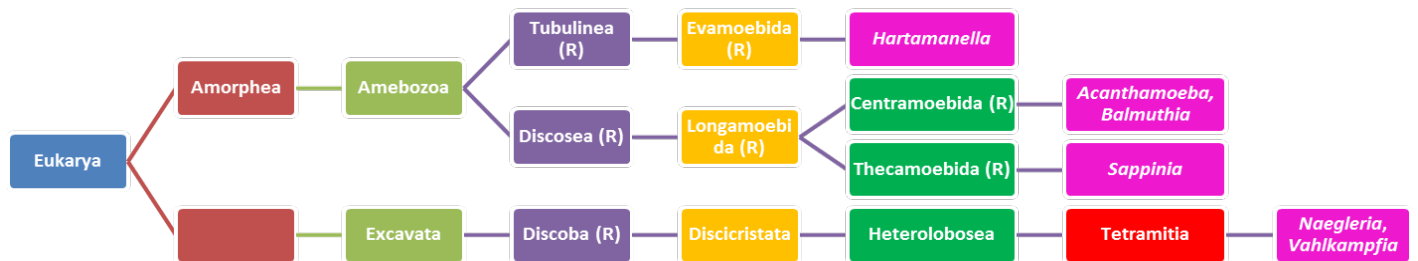
FIGURA 1. Número de publicaciones recogidas en PubMed desde 1933 hasta 2014 relativas a *Acanthamoeba*. Datos obtenidos de [www.pubmed.org](http://www.pubmed.org) el 30 de diciembre de 2013.

### 1.2.2. Filogenia

*Acanthamoeba* se encuentra recogida en el reino Protista. Este reino fue descrito por Ernst Haeckel en 1866 y en él se incluyen todos aquellos organismos eucariotas que no pudieron ser clasificados como hongo, planta o animal. Tradicionalmente este reino se subdividió en grupos atendiendo a la semejanza de sus integrantes con los reinos superiores, de esta manera se distinguían los protozoos unicelulares similares a animales, protofitas similares a plantas (en su mayoría algas unicelulares) y mohos mucilaginosos y mohos acuáticos similares a hongos. Debido a que estos grupos solapaban entre ellos las nuevas clasificaciones están basadas en filogenias. En un principio se intentó crear una clasificación monofilogenética (Figura 2) en base a características ultraestructurales, bioquímicas y genéticas. La última clasificación de los eucariotas llevada a cabo por el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad Internacional de Protistólogos y publicado por Adl y col. (2012) se basa en características filogenéticas, por lo que el conjunto de las AVL, ha quedado separado en distintos grupos (Figura 3). A pesar de las diferentes clasificaciones filogenéticas el término ameba sigue utilizándose para denominar organismos muy dispares en cuanto a su tamaño (5  $\mu\text{m}$  – 5 mm), patogenicidad, distribución, etcétera; pero todos ellos comparten como forma de desplazamiento el movimiento ameboide.



**FIGURA 2. Árbol monofilético del reino Protista, subreino Protozoa.** En este grupo se incluyen diferentes amebas de vida libre. Este árbol se creó según características morfológicas y aunque actualmente no está aceptado sigue siendo útil para la descripción de la morfología y ecología de los protistas. Modificado de Khan (2009).



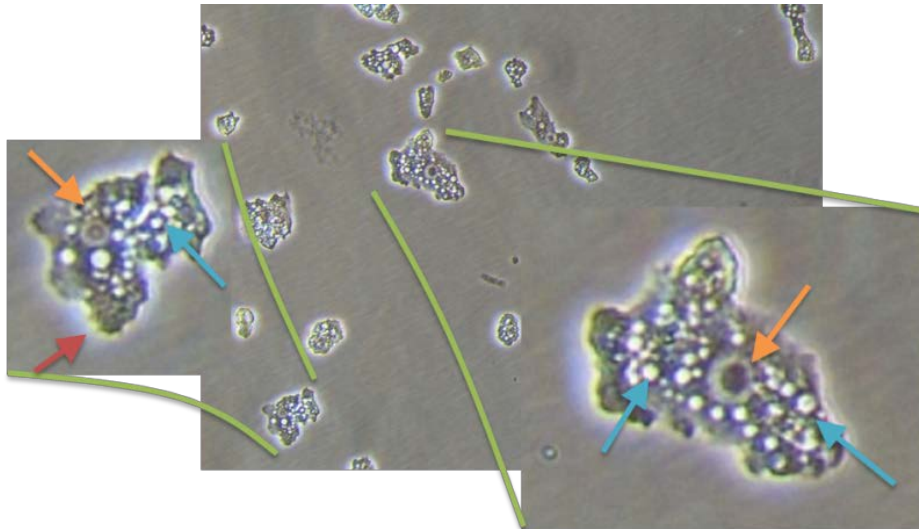
**FIGURA 3. Árbol filogenético.** Se recogen únicamente aquellas divisiones relacionadas con las amebas de vida libre objeto del presente estudio. (R): ribogrupos establecidos por estudios filogenéticos.

### 1.2.3. Morfología

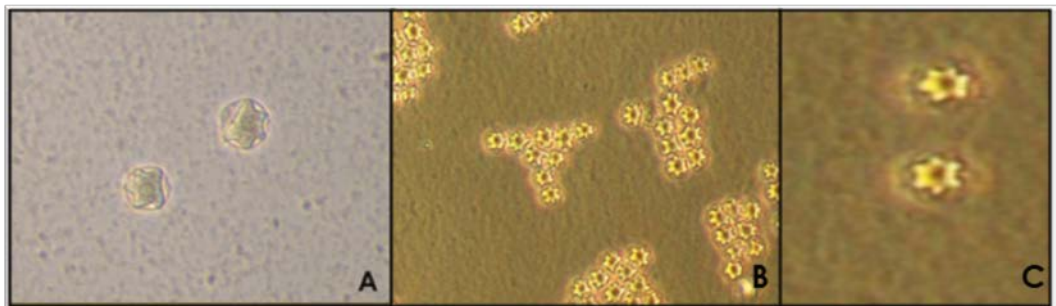
*Acanthamoeba* se ha enmarcado tradicionalmente en el grupo de los protozoos con locomoción ameboide a través de pseudópodos, de ahí el sufijo -amoeba en su descripción. Posee además en el citoplasma unas estructuras similares a espinas, que le otorgan el prefijo *acantha-* a su descripción pues significa espina en griego. Actualmente estas estructuras son conocidas como acantopodia y participan en la adhesión de estos protozoos a superficies tanto inertes como biológicas, en el movimiento y en la captura de alimento. Los acantopodos son estructuras del citoesqueleto que sobresalen del cuerpo celular con un citoplasma hialino sin las vacuolas típicas del interior celular (Khan, 2009).

*Acanthamoeba* alterna en su ciclo de vida dos morfologías, la forma activa o de trofozoito y la forma de resistencia o de quiste. El trofozoito puede medir entre 14 y 40  $\mu\text{m}$ ; es uninuclear con un nucléolo prominente de gran tamaño; con una gran vacuola contráctil y un gran número de vacuolas además de los característicos acantopodos (Figura 4).

El quiste se caracteriza por su forma redondeada y puede medir entre 5 – 20  $\mu\text{m}$  dependiendo de la especie/genotipo (Figura 5). Está formado por dos paredes, la externa o ectoquiste es rugosa con pliegues y ondas, compuesta por proteínas y lípidos. La pared interna o endoquiste está formada por celulosa y se une con el ectoquiste en los poros u ostiolas que, a su vez está cubiertos con unos tapones cóncavo-convexos. Los quistes son capaces de sobrevivir a la desecación, frío, calor, falta de alimento además de ser una forma de diseminación en el ambiente. Existen estudios que prueban que estos quistes permanecen viables después de 20 años (Sriram y col., 2008).



**FIGURA 4. Trofozoítos de *Acanthamoeba* USP-GM-A3 en cultivo axénico.** En la imagen ampliada de los trofozoítos puede observarse el núcleo con un nucléolo grande rodeado de una zona característica (flecha naranja), un citoplasma cargado de vacuolas (flecha azul) y los acantopodos como pequeñas proyecciones del citoplasma (flecha roja) (aumento original x200).



**FIGURA 5. Quistes de *Acanthamoeba* USP- A45-CR5.** **A:** quistes en medio líquido formados tras la privación de nutrientes. Pueden apreciarse tanto el ectoquiste como el endoquiste, observándose 4-5 brazos por quiste (aumento original x400). **B:** quistes en agar no nutritivo. El ectoquiste no se observa; se aprecian 4-7 brazos por quiste (aumento original x200). **C:** ampliación de la imagen B.

### 1.2.4. Clasificación y genotipado

La primera clasificación de *Acanthamoeba* se realizó por Pussard y Pons (1977) atendiendo únicamente a la morfología del quiste pues el trofozoito no permite la caracterización a nivel de especie. El género *Acanthamoeba* se dividió entonces en 3 grupos morfológicos, grupo I, II y III, en los que se clasificaron las 18 especies de *Acanthamoeba* descritas hasta ese momento (Figura 6).

Grupo I. Son los quistes más grandes. Diámetro  $\geq 18 \mu\text{m}$ . Comprende 3 especies (Figura 7):

*A. astronyxis*                      *A. comandoni*                      *A. echinulata*

Grupo II. Son los más frecuentes. Con quistes pequeños o medianos. Diámetro  $< 18 \mu\text{m}$ . El endoquiste es globoso, ovoide o poligonal. Nunca estrellado como los del grupo I. Con la pared externa muy visible y con el tamaño del poro grande. Comprende 10 especies (Tabla 1):

*A. castellanii*                      *A. quina*                      *A. griffini*  
*A. mauritaniensis*                      *A. rhyodes*                      *A. triangularis*  
*A. polyphaga*                      *A. divionensis*  
*A. lugdunensis*                      *A. paradioensis*

Grupo III. Son los menos frecuentes. Con quistes pequeños. Diámetro  $< 18 \mu\text{m}$ . Con el endoquiste globoso u ovoide pero nunca estrellado o poligonal. La pared externa es muy fina, muchas veces irreconocible. Los poros son difíciles de ver en fresco. Comprende 5 especies (Tabla 2):

*A. palestinensis*                      *A. lenticulata*                      *A. royreba*  
*A. culbertsoni*                      *A. pustulosa*

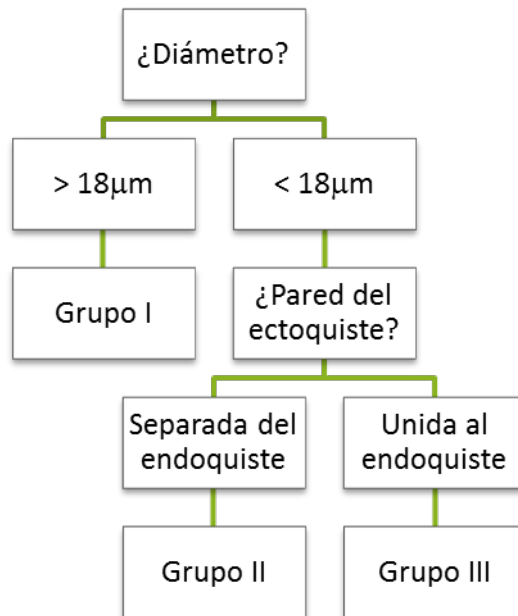


FIGURA 6. Algoritmo para la clasificación de *Acanthamoeba* dentro de los tres grupos morfológicos descritos por Pussard y Pons (1977).

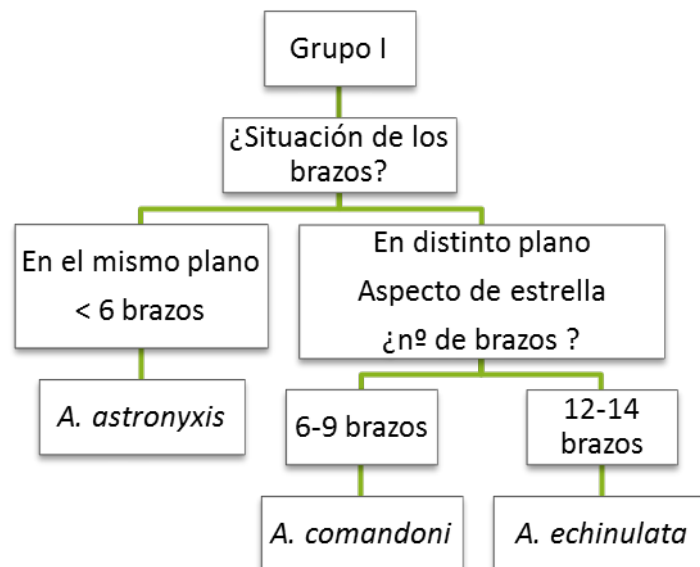


FIGURA 7. Algoritmo para la clasificación dentro del grupo I de Pussard y Pons (1977).

TABLA 1. Características generales de las diferentes especies de *Acanthamoeba* Grupo II según Pussard y Pons (1977). NR: no representativo

	ϕ	Pared		Brazos	Opérculo	Endo/exoquiste	Otros
		Exterior	Interior				
A. castellani	14-15 μm	Muy densa y rugosa	Forma poliédrica o con brazos cónicos cortos, largos o irregulares	Brazos cónicos cortos, largos o irregulares que no se observan muy desarrollados	Los poros se distinguen muy bien. Diámetro de 2 μm y con un círculo de 1 μm en el interior con coloración más clara (a veces). De perfil tiene forma de cono y desde arriba como un anillo o una bóveda	Endoquiste globoso que se une a la pared externa por unos pequeños brazos cónicos	Se observa una capa periférica de gránulos citoplasmáticos en el endoquiste
A. mauritaniensis	14 μm	Bastante gruesa de contorno circular y rugoso. Forma unos pliegues separados por huecos muy característicos	Un poco más clara que la exterior	Muy poco desarrollados o inexistentes <b>Nº = 5</b>	NR	Endoquiste globoso u ovoide, raramente poliédrico	Citoplasma del quiste con granulación fina lo que le da un aspecto vítreo. La capa periférica de gránulos plasmáticos es poco visible y muy desordenada
<i>A. castellani</i> y <i>A. mauritaniensis</i> tienen en común la reticularización de sus quistes. Forman un subgrupo							
A. triangularis	13 μm	Más gruesa que la interna. Ondulada y unida a la interior en los ángulos de los polígonos formados por el endoquiste	Muy fina	<b>Nº &lt; 4</b>	NR	Endoquiste de aspecto geométrico: triángulo isósceles, equilátero, romboideo o trapecio curvilíneo	La capa periférica de gránulos plasmáticos se ve muy clara y ordenada

Tabla 1 continuación. Características generales de las diferentes especies de *Acanthamoeba* Grupo II según Pussard y Pons (1977). NR: no representativo

	$\phi$	Pared		Brazos	Endo/exoquiste	Otros
		Exterior	Interior			
<i>A. polyphaga</i>	14 $\mu\text{m}$	Muy fina y muy separada del endoquiste. Parcialmente dilatada en una zona. Su contorno es el más irregular	Muy irregular y prácticamente nunca estrellada. Grosor similar a la exterior	Nº=5	NR	Características similares a <i>A. mauritaniensis</i> y <i>A. quina</i> pues es una especie intermedia entre ambas
<i>A. lugdunensis</i>	14 $\mu\text{m}$	Delgado, débilmente ondulado y unido al endoquiste. Contorno irregular	NR	Cuando aparecen son largos y poco prominentes Nº = 7	Endoquiste poliédrico con bordes redondeados Redondeado u ovalado similar al grupo III	La capa periférica de gránulos plasmáticos es poco visible. Se distingue de <i>A. quina</i> en que el nº de brazos de esta última no sobrepasa de 5 y <i>A. lugdunensis</i> , sí.
<i>A. quina</i>	12 $\mu\text{m}$	Delgada poco plisada	Más gruesa que la exterior	NR	Forma globosa, ovoide, piriforme, a veces cuadrangulares y pentagonales	La capa periférica de gránulos plasmáticos se ve muy clara y ordenada
<i>A. griffini</i>	14 $\mu\text{m}$	Se une a la interior confiriendo al quiste una forma estrellada. Es más ondulada que arrugada	Grosor similar a la exterior. Tiene forma de rueda de engranaje	Si aparecen tiene forma de estrella, muy definidos, más largos al final Nº=6	Formas muy diversas: redondas u ovoides; con o sin brazos cortos.	La capa periférica de gránulos plasmáticos se ve muy clara

Tabla 1 continuación. Características generales de las diferentes especies de *Acanthamoeba* Grupo II según Pussard y Pons (1977). A chaud y TAPAg r: diferentes tinciones. . NR: no representativo

	$\phi$	Pared		Brazos	Endo/exoquiste	Otros
		Exterior	Interior			
A. rhyssodes	16 $\mu\text{m}$	Menos plisada que la de <i>A. castellani</i> . No se une a la interior entre los poros por lo que se parece a <i>A. astronyxis</i> . Contorno circular	De la misma densidad que la exterior	Cónicos y delgados Pueden aparecer como protuberancias. En forma de rueda de engranaje <b>N°=7-7.5</b>	Endoquiste globoso	Similar a <i>A. castellani</i> . Para distinguir <i>A. castellani</i> de <i>A. rhyssodes</i> : en cultivo con un 27% de NaCl la primera prácticamente no se multiplica y en 10% de NaCl los quistes de <i>A. castellani</i> son menos estrellados que los de <i>A. rhyssodes</i> .
A. divionensis	13 $\mu\text{m}$	Más fina que la interna. Generalmente lisa. No unida a la interna. Contorno circular.	NR	Los brazos cilíndricos se unen a la pared externa que se dilata ligeramente como un cuello de botella <b>N°=5-6</b>	Endoquiste globoso u ovoide a menudo deformado por protuberancias a veces cilíndricas. El endoquiste recuerda a una "bombona de laboratorio" con uno o más cuellos	Los infundíbulos de los poros son muy reducidos o inexistentes. La capa periférica de gránulos plasmáticos es más fina que en <i>A. rhyssodes</i>
A. paradivionensis	16 $\mu\text{m}$	Más ondulada que en <i>A. divionensis</i> . No se une a la interior	Grosor similar a la exterior	Cortos, anchos y cilíndricos <b>N° &gt;= 7</b>	Endoquiste redondeado con muchas protuberancias (nunca estrellado)	Muy similar a <i>A. divionensis</i> pero con los infundíbulos muy marcados

TABLA 2. Características generales de las diferentes especies de *Acanthamoeba* Grupo III según Pussard y Pons (1977). NR: no representativo

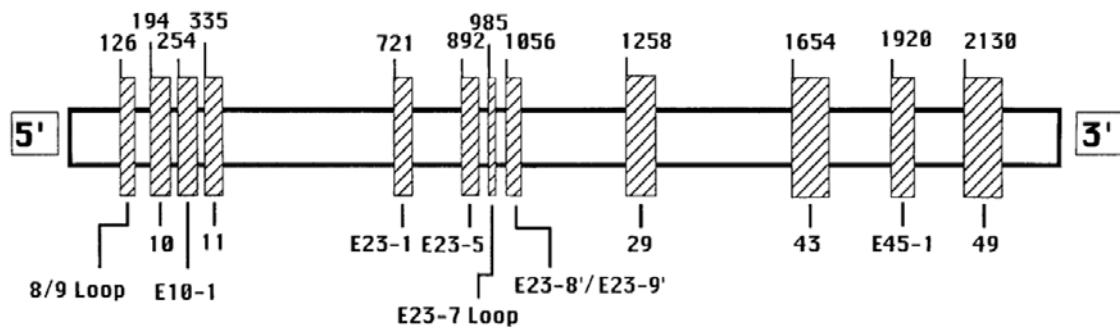
	$\phi$	Pared		Brazos	Endo/exoquiste	Otros
		Exterior	Interior			
A. palestinesis	18 $\mu$ m	Muy fina y pegada a la interior. A veces un poco ondulada. Muy difícil de ver	NR	Nº=7-8	Endoquiste globoso u ovoide. Puede ser un poco poligonal pero nunca estrellado	La capa periférica de gránulos plasmáticos está ordenada en una única fila pero no se observa muy nítida
A. culbertsoni	15 - 18 $\mu$ m	Mucho más fina que la interior Un poco ondulada y unida a la interior	NR	Nº=5-6	Endoquiste notablemente redondeado Muy raramente aparecen los brazos	La capa periférica de gránulos plasmáticos prácticamente no se distingue. Se observa claramente la corona de corpúsculos perinucleares
A. lenticulata	13 $\mu$ m	Muy pegada a la interior A veces es delgada y ligeramente ondulada o más gruesa y arrugada (como los dientes de una sierra)	Siempre más gruesa que la exterior	Nº=4-5	Endoquiste de contorno circular	NR
A. pustulosa	14 $\mu$ m	Muy fina, poco rugosa y muy pegada a la interior. Es difícil de ver	NR	Nº=7-9	Endoquiste redondeado con algún ángulo poco saliente y una protuberancia	NR
A. royreba	15 $\mu$ m	Muy poco visible, ligeramente ondulada y sobre la interior	Mucho más gruesa que la exterior	Nº = 12-14	Endoquiste redondeado u oval muy poco poligonal (sin ángulos)	Citoplasma finamente granuloso La capa periférica de gránulos plasmáticos está compuesta por elementos muy pequeños

A pesar de que la clasificación de Pussard y Pons (1977) se ha mantenido hasta la actualidad con la incorporación de nuevas especies (Qvarnstrom y col., 2013, Visvesvara, 1991, Visvesvara y col., 2007b), está siendo relegada por la clasificación en genotipos según la secuencia del gen de la subunidad pequeña 18S del ARN ribosómico (ARNr) (Gast y col., 1996). El porqué del abandono de la clasificación basada en la morfología se debe a que, dependiendo del medio de cultivo en el que crezcan las amebas, estas pueden adquirir características morfológicas que las definirían como una especie distinta (en la Figura 5 pueden observarse quistes de la misma cepa de *Acanthamoeba* con número diferente de brazos según el medio en el que se obtuvieron). Por otro lado la clasificación binominal heredada de la caracterización morfológica también está en desuso ya que una especie identificada por su morfología podría corresponderse con más de un genotipo y viceversa. Es más, diferentes estudios bioquímicos, de crecimiento, distribución o patogenicidad han puesto de manifiesto las incoherencias entre especies/cepas/ genotipos (Gast y col., 1996, Khan y Tareen, 2003).

El primer intento de clasificación no morfológica se hizo en base a la distribución de isoenzimas (Costas y Griffiths, 1984), aunque no demostró ser un método más eficaz que el morfológico. Por todo ello, Gast y col. (1996) propusieron la clasificación de *Acanthamoeba* basada en el gen de la subunidad pequeña 18S de ARNr definiendo 4 genotipos denominados con la letra T seguido de un número entero (T1, T2, T3 y T4). Los 4 genotipos se establecieron siguiendo un criterio de disparidad entre secuencias del gen completo de al menos el 6%. Posteriormente Stothard y col. (1998) propusieron bajar el umbral a un 5% y, más recientemente Corsaro y Venditti (2010) sugirieron una aplicación más laxa de este 5%. Siguiendo estos criterios en la actualidad se han encontrado 14 nuevos genotipos (Corsaro y Venditti, 2010, Hewett y col., 2003, Horn y col., 1999, Nuprasert y col., 2010, Qvarnstrom y col., 2013, Stothard y col., 1998).

El gen de la subunidad 18S del ARNr tiene 12 regiones variables que se distribuyen de acuerdo a la Figura 8. Aunque el consenso establecido para la descripción de nuevos genotipos incluye las 12 regiones (Corsaro y

Venditti, 2011), el genotipo T15 se describió únicamente con el fragmento GTSA.B1 que incluye 8 de estas regiones (aproximadamente 1500pb) pero está ampliamente aceptado. En el caso del genotipo T16 existen dos descripciones diferentes, una que se basa en el fragmento Ami<sup>1</sup> con tan solo 5 de las regiones variables (aprox. 850 pb) (Łanocha y col., 2009) y otro con la secuencia completa del gen para la subunidad 18S del ARNr (Corsaro y Venditti, 2010).



**FIGURA 8.** Esquema de la distribución de las 12 regiones variables del gen de la subunidad 18S del ARNr. La localización de las diferentes regiones se indica en la parte inferior de la figura y se corresponden con los bucles ("loops") y "stems" predichos por Neefs y col. (1993). Los números de la parte superior indican los pares de bases donde comienzan las diferentes regiones de acuerdo a la secuencia de *A. castellanii* Neff (GenBank #U07416). Figura tomada de Gast y col. (1996)

A pesar de que los 18 genotipos no se correspondan con las 25 especies de *Acanthamoeba* descritas, esta nueva clasificación es un muy buen representante de la amplia distribución, variabilidad y capacidad de colonizar nuevos medios de este género. Booton y col. (2005) estudiaron la distribución de los diferentes genotipos en el ambiente y como agentes causales de patología encontrando que el genotipo T4 es el más común tanto en el medio ambiente como en aislados de individuos con patología. Los genotipos T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12, T15 y T18 también se han descrito como causantes de patología. En una revisión más reciente de la frecuencia de *Acanthamoeba* (Maciver y col., 2013) el genotipo T4 volvió a presentarse como el más abundante en la naturaleza y el más

<sup>1</sup> **Fragmento Ami:** fragmento del gen de la subunidad 18S del ARNr amplificado por los cebadores ami6F y ami9R que incluye 5 de las 12 de las regiones variables de dicho gen

comúnmente asociado a patología seguido por los genotipos T3 y T11, que son los genotipos más cercanos a T4 en los árboles filogenéticos. Por otro lado, el genotipo T5 fue el más descrito en agua dulce. Los otros genotipos se han aislado con frecuencias muy bajas a excepción del genotipo T11.

### 1.2.5. Organización genómica nuclear

En los trofozoítos de *Acanthamoeba* aparece generalmente un único núcleo que ocupa un sexto del volumen celular, rodeado por una doble membrana con separación de 35 nm. Posee entre 1 y 2 nucléolos. La organización cromosómica de *Acanthamoeba* no está clara; Rimm y col. (1988) a través de un estudio en campo pulsado detectaron la presencia de 17 cromosomas con una organización poliploide de 25n (Byers, 1986). Independientemente del número de cromosomas, Anderson y col. (2005) estudiaron el genoma de *Acanthamoeba* con una cobertura de 0.5x mostrando una capacidad biosintética más elevada que la de otras amebas como *Entamoeba histolytica* lo que explicaría su gran adaptabilidad a los diferentes ambientes en los que se ha podido aislar. Dentro del genoma de *Acanthamoeba* se han identificado una gran variedad de genes implicados en la síntesis de nutrientes esenciales como serina, cisteína, triptófano, arginina, histidina, purinas y pirimidinas, desoxinucleótidos y folatos entre otros demostrando su facilidad para obtener nutrientes de fuentes muy variadas. Presenta, además, un número muy elevado de genes que codifican para diferentes kinasas así como para su receptor y reguladores de transducción de señales lo que sugiere la capacidad de *Acanthamoeba* para interactuar con el ambiente y responder a señales externas. Se ha identificado también el gen para la trealosa-6-fosfato sintetasa que es una enzima muy relacionada con la protección a condiciones ambientales difíciles tales como la desecación, estrés osmótico, temperaturas o pH extremos confirmando su alta capacidad de supervivencia y adaptabilidad. Se han identificado también otros genes típicos del metabolismo y ciclo celular como aquellos que participan en la formación del quiste (gen para la formación de celulosa), o para su lisis (celubiosidasa) cuando emerge el trofozoíto. Se ha

estudiado también la unidad transcripcional para el ARN ribosómico (ARNr) de *Acanthamoeba* con una longitud de 12kpb de los cuales 9.7kpb incluyen el espaciador transcripcional externo (ETS), los espaciadores transcripcionales internos (ITS), 18S ADNr, 5.8S ADNr y 26S ADNr y, los 2.3 kpb restantes se corresponden con el espaciador intergénico (Yang y col., 1994). A pesar de que existen únicamente 24 copias por genoma haploide el número asciende a 600 copias por célula debido al genoma poliploide (25n).

En estudios más recientes, Clarke y col. (2013) ponen de manifiesto la importancia de la transferencia lateral de genes (TLG) en el genoma de *Acanthamoeba*. Describen 15.455 genes ricos en intrones de los cuales la mayoría provienen de TLG entre reinos y que ya han sido incorporados a la maquinaria transcripcional de *Acanthamoeba* (Figura 9). Dichos autores señalan que el rico y complejo sistema de señalización y comunicación celular de *Acanthamoeba* (incluyendo la cadena completa de señalización por tirosin-quinanasas) además de la diversidad de los receptores extracelulares predichos, son comparables a los de los mohos mucilaginosos celulares (Dictiostélidos). Además, como *Acanthamoeba* es un hospedador para una gran variedad de bacterias y virus, posee un amplio repertorio predicho de receptores de reconocimiento de patrones con funciones ortólogas a las de la respuesta inmune innata de organismos superiores.

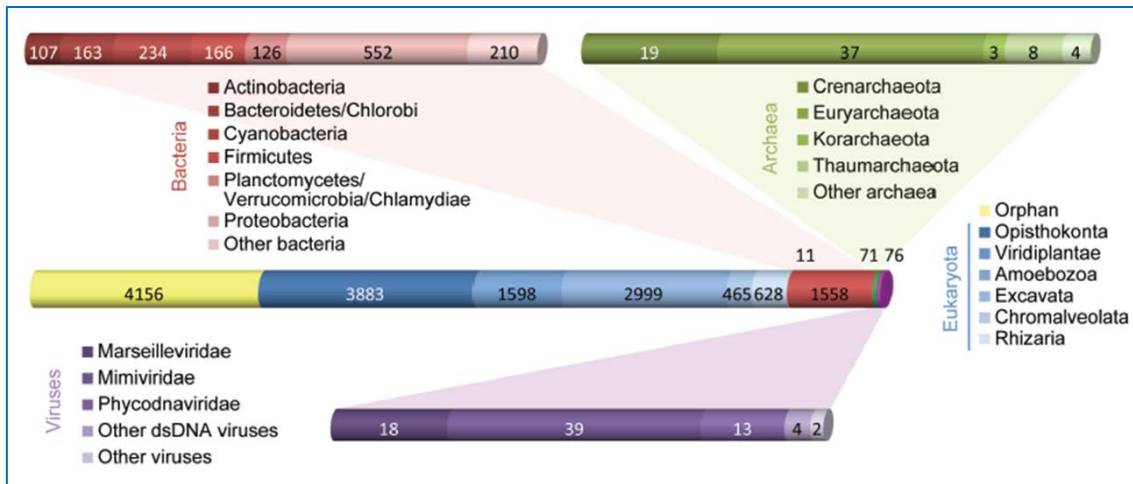


FIGURA 9. Composición del genoma de *Acanthamoeba* según la similitud de secuencias.

Para cada proteína se muestra el mejor análisis "BLASTP" en una base de datos no redundante. En la barra central se representan todos los genes anotados de *Acanthamoeba* coloreados según su similitud con los diferentes reinos: Eukaryota (azul), Bacteria (rojo), Archaea (verde) y virus (morado); los genes huérfanos se representan en amarillo. Tomado de Clarke y col. (2013).

### 1.2.6. Organización genómica mitocondrial

El genoma mitocondrial completo de *Acanthamoeba castellanii* genotipo T4 es circular y está compuesto por 41.591 pb con un contenido de A+T del 70,6% (Burger y col., 1995). En él se han descrito los genes recogidos en la Tabla 3: dos genes para el ARNr (subunidad grande y pequeña), 16 genes para el ARN de transferencia, 33 proteínas (17 subunidades de la cadena respiratoria y 16 proteínas ribosómicas), 8 marcos abiertos de lectura (ORF del inglés *Open Reading Frame*) con más de 60 codones y sin función determinada. Dos de estos ORFs (orf124 y orf142) tienen homólogos en otros ADNs mitocondriales (orf25 y orfB respectivamente), 3 ORFs (orf83, orf115 y orf349) son únicos de *A. castellanii* y tres son ORFs intrónicos.

Las características más notables del genoma mitocondrial de *Acanthamoeba* son las siguientes:

- Todos los genes y ORFs se encuentran en la misma hebra y están muy empaquetados; únicamente el 6,8% de las secuencias no tienen una función codificadora y los espaciadores intergénicos son pequeños con un tamaño de entre 1 a 616 pb con una media de 64 pb. Diez parejas

de genes codificantes para proteínas se superponen en 38 pb y dos subunidades del citocromo oxidasa, COX 1 y COX2, se encuentran en un único ORF.

- Existen únicamente 3 intrones, todos ellos del grupo I en el gen para la subunidad grande del ARNr.
- En el genoma mitocondrial existe un número de genes que codifican para el ARN de transferencia menor al necesario para la síntesis de proteínas mitocondriales por lo que Burger y col (1995) sugirieron que los ARN de transferencia no codificados por la mitocondria son importados del citosol.
- El código genético para el ADN mitocondrial de *A. castellanii* está modificado codificando UGA para el triptófano.
- No existen secuencias repetidas o motivos asociados a elementos regulatorios.

**TABLA 3. Genes identificados en el ADN mitocondrial de *Acanthamoeba castellanii*.** Los números en paréntesis indican el número de genes. Modificado de Burger y col. (1995).

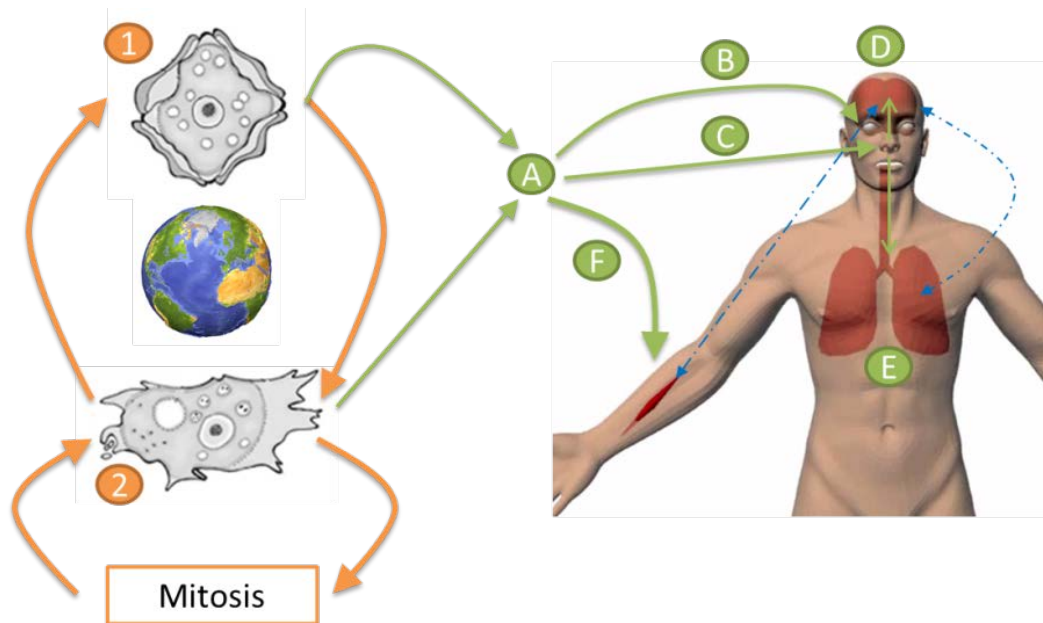
Distribución de genes en el ADN mitocondrial de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	
A.	ARN ribosómico (2) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Subunidad grande (rnl)</li> <li>• Subunidad pequeña (rns)</li> </ul>
B.	ARN de transferencia (16)
C.	Transporte electrónico/ fosforilación oxidativa (16) <ul style="list-style-type: none"> <li>• NADH deshidrogenasa (nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6, nad7, nad9, nad11)</li> <li>• Apocitocromo b (cob)</li> <li>• Citocromo oxidasa (cox1/2, cox3)</li> <li>• Complejo ATP sintetasa (3) <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ F0-ATPasa (atp6, atp9 )</li> <li>◦ F1 ATPasa (atp1 )</li> </ul> </li> </ul>
D.	Proteínas ribosómicas (16) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Subunidad pequeña (10), (rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps13, rps14, rps19)</li> <li>• Subunidad grande (6), (rpl2, rpl5, rpl6, rpl11, rpl14, rpl16)</li> </ul>
E.	Marcos abiertos de lectura ( <i>ORF= Open Reading Frame</i> ) conservados de función desconocida (2) <ul style="list-style-type: none"> <li>• orf142 (= ymf19; Aca), homólogo al orfB del ADN mitocondrial de las angiospermas y hepaticofitas.</li> <li>• orf124 (= ymf39; Aca), homólogo al orf25 del ADN mitocondrial de las angiospermas y hepaticofitas.</li> </ul>
F.	Marcos abiertos de lectura únicos del ADN mitocondrial de <i>A. castellanii</i> (3) <ul style="list-style-type: none"> <li>• orf83 (= ymf49), orf115 (= ymf50), orf349 (= ymf51)</li> </ul>
G.	Intrones del grupo I de los marcos abiertos de lectura (Group I intronic ORFs) (3) <ul style="list-style-type: none"> <li>• i1-orf (= ymf46), i2-orf (= ymf47), i3-orf (= ymf48)</li> </ul>

### 1.2.7. Ciclo biológico.

*Acanthamoeba* alterna en su ciclo biológico (Figura 10) dos estados, una forma vegetativa o **trofozoíto** (2) que se alimenta vorazmente de bacterias y detritus presentes en el ambiente y que se reproduce por fisión binaria, y una forma durmiente de resistencia, el **quiste** (1).

Cuando el alimento empieza a escasear en el medio o cuando el trofozoíto debe enfrentarse a la desecación u otros factores de estrés ambientales comienza a redondearse y forma el quiste. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser óptimas para el crecimiento, la ameba que estaba en estado durmiente dentro del quiste, se activa y sale por los opérculos del quiste revertiendo a la forma vegetativa (Page, 1967).

Si se dan las condiciones adecuadas, *Acanthamoeba*, puede producir infecciones en el hombre y aunque la forma infectante es el trofozoíto, ambas formas pueden penetrar (A) en el hospedador humano. Según la vía de entrada puede causar diferentes patologías: por vía ocular (B) produce queratitis amebiana, por vía inhalatoria (C) causa neumonía (E) o EGA (D) o bien por vía cutánea (F) donde produce acanthamebiasis cutánea. Además de estas vías de entrada puede existir una diseminación hematogena de este protozoo. En el único caso en que dicha diseminación no ha sido descrita es en la queratitis amebiana.



**FIGURA 10. Ciclo biológico de *Acanthamoeba* sp.** 1: quiste; 2: trofozoito; A: entrada en el hombre como quiste o trofozoito; B: infección ocular: queratitis amebiana; C: aspiración, D: Encefalitis Granulomatosa Amebiana, E: neumonía; F: penetración por piel: acanthamebiasis cutánea. Las flechas discontinuas representan la posible diseminación hematogena entre los distintos órganos infectados.

### 1.2.7.1. Cultivo en el laboratorio.

El ciclo biológico de *Acanthamoeba* se reproduce fácilmente en el laboratorio. Este protozoo puede cultivarse en placas de agar no nutritivo tapizadas con bacterias como *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes*. En el cultivo *in vitro*, *Acanthamoeba* muestra preferencia por las bacterias no encapsuladas o pigmentadas debido a que la capsula mucoide de las bacterias inhibe la fagocitación y los pigmentos suelen ser tóxicos (Visvesvara y col., 2007b).

Las amebas se alimentan de las bacterias, se dividen y acaban cubriendo por completo la superficie de la placa. Dependiendo de la cepa/ especie de *Acanthamoeba* de la que se trate este proceso puede tardar desde un par de días hasta un semana aproximadamente ya que los tiempos de generación varían de entre 8 a 24 horas (Khan, 2009). Debido a que el crecimiento en placa no permite añadir más nutrientes, en este caso bacterias, las amebas empiezan a redondearse para formar los quistes. Estos quistes pueden revertir en trofozoitos si un

fragmento de la placa original se dispone en una nueva placa tapizada con bacterias. Tras la cual, se producen placas de lisis en el tapizado de bacterias y surcos en la superficie que corresponden con el movimiento de los trofozoítos y la fagocitación de las bacterias. Los quistes pueden mantenerse en la placa de agar con pases periódicos a nuevas placas o se pueden mantener desecados por periodos de tiempo prolongados, de hasta 20 años (Sriram y col., 2008). El método de cultivo en placa de agar no nutritivo está recomendado para el aislamiento y diagnóstico de *Acanthamoeba* procedentes de raspados corneales, biopsias, muestras ambientales, etcétera. (Visvesvara y col., 2007b).

Existe también un medio líquido para el cultivo de *Acanthamoeba*, medio PYG, que consiste en una mezcla de peptona, extracto de levadura y glucosa con una concentración de 0,05%, 0,05% y 0,1% (p/v) respectivamente. La ventaja de este medio sobre las placas de agar es que permite la axenización de las cepas que han sido previamente aisladas en agar. El medio PYG se suplementa con una combinación de antibióticos, generalmente penicilina, estreptomycinina o gentamicina y puede enriquecerse con una concentración de peptona mayor, extracto de levadura, glucosa y suero bovino fetal. A este medio también pueden añadirse bacterias inactivadas como nutriente dependiendo de los requerimientos de las cepas de *Acanthamoeba* que vayan a ser cultivadas. En este último caso se perdería la axenización pero permite la obtención de concentraciones más elevadas de *Acanthamoeba* que en placa de agar (Schuster, 2002, Visvesvara y col., 2007b).

Por último, *Acanthamoeba*, también puede crecer sobre cultivos celulares como células Vero E6 (Schuster, 2002).

### 1.3. DISTRIBUCIÓN

*Acanthamoeba* es un protozoo oportunista y anfizoico incluido dentro del grupo de AVL patógenas para el hombre con una distribución cosmopolita tanto en suelo, aire como agua. Puede sobrevivir en salobres, agua dulce o salada, arena de playa, agua residual, acuarios, lentes de contacto, unidades dentales o de diálisis entre otros (Schuster y Visvesvara, 2004b). Se ha aislado también de vegetales y algunos animales como peces, reptiles, perros, monos o pájaros (Visvesvara y col., 2007b). *Acanthamoeba* es capaz de colonizar nichos tan diferentes gracias a que es capaz de sobrevivir a un amplio rango de osmolaridad, temperatura, salinidad y pH (Khan, 2009, Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Visvesvara y Maguire, 2006).

En la Tabla 4 se recogen algunas de las diferentes muestras donde se ha identificado *Acanthamoeba*. Son muchos los ejemplos que ponen de manifiesto la ubicuidad de este protozoo y su capacidad de adaptación a condiciones tan extremas como la salinidad de un salobral (Sawyer y col., 1977) o las bajas temperaturas de la Antártida (Brown y col., 1982).

Respecto a la presencia de las AVL en las plantas de tratamiento de agua, existen varios estudios alrededor del mundo que demuestran la presencia de estas amebas tanto a la entrada como a la salida. Debido a la ubicuidad de las amebas, estas pueden entrar en las plantas de tratamiento por agua, arena, aire, animales e incluso plantas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Hoffmann y Michel (2001) encontraron en la entrada de una ETAP una concentración de 90.000 amebas/l pertenecientes a 17 géneros diferentes y a la salida de la misma la concentración quedó reducida a 4.000 amebas/l y a tan solo 8 géneros. A pesar de la existencia de una reducción importante en la concentración de amebas, esta sigue siendo alta a la salida lo que muestra la incapacidad de los tratamientos para eliminar grandes concentraciones de AVL.

Por otro lado, aun cuando la concentración de entrada en planta es baja, la ineficacia de los métodos de tratamiento vuelve a hacerse patente, pues en la salida siguen detectándose estas amebas (Corsaro y col., 2010, Thomas y col., 2008). Este fenómeno puede explicarse por el hecho de que el lecho de

filtración puede estar colonizado por las amebas (Bomo y col., 2004). Es más, estas AVL pueden colonizar filtros nuevos dentro de las plantas de tratamiento de agua en pocas semanas desde su instalación y son, además, resistentes al lavado habitual de los mismos (Thomas y Ashbolt, 2011). Uno de los problemas fundamentales de la presencia de *Acanthamoeba* y otras amebas en la salida de las plantas es que pasan a los sistemas de distribución de agua donde colonizan nuevos medios (Hoffmann y Michel, 2001, Thomas y col., 2008). Diferentes estudios han demostrado que la concentración de amebas en los sistemas de distribución aumenta con la distancia a la planta debido a que la concentración de desinfectante residual se reduce, lo que permite el crecimiento del biofilm (Langmark y col., 2007). Estos biofilms proporcionan el nicho ecológico perfecto para que *Acanthamoeba* pueda interactuar con los diferentes microorganismos resistentes a amebas (ver punto 1.5).

Un punto crítico en los sistemas de distribución de agua respecto a la presencia de *Acanthamoeba* son los tanques de agua potable y las cisternas. Tanto en un estudio de Hong Kong (Boost y col., 2008) como en uno de Corea (Jeong y Yu, 2005) se demostró que la presencia de *Acanthamoeba* en los grifos de los bloques de apartamentos con tanques en el techo era mayor que en los bloques que recibían el agua directamente de los sistemas de distribución. Esto puede deberse a que estos tanques en ocasiones no están cerrados, tienen un sistema de mantenimiento deficiente o no se limpian con la frecuencia adecuada (Seal y col., 1992).

En cuanto a la presencia de *Acanthamoeba* y otras AVL en EDARs los trabajos son escasos y se centran fundamentalmente en la salida de las mismas o en los lodos. Encontramos como ejemplo la presencia de *Acanthamoeba* en lodos de EDARs en un estudio realizado con muestras de Sudáfrica (Schroeder y col., 2001) y otro de Reino Unido (Gaze y col., 2011) donde, además describieron la presencia de mimivirus en el interior de las amebas. Así mismo, Nerad y col. (1995) describieron la presencia de *Acanthamoeba* en fondos oceánicos contaminados por el agua tratada de una EDAR en Philadelphia (EEUU).

Si bien es cierto que la presencia de *Acanthamoeba* es elevada en el medio ambiente y que, como demuestran diferentes estudios de seroprevalencia en población sana, existe una exposición del hombre a estas AVL, el número de casos de QA y EGA son menos frecuentes de lo esperado (Cerva, 1989, Cursons y col., 1980, Chappell y col., 2001, da Rocha-Azevedo y col., 2009, Marciano-Cabral y col., 2000, Powell y col., 1994).

TABLA 4. Algunos ejemplos de *Acanthamoeba* en diferentes muestras ambientales.

	Tipo de muestra	Localización	Referencia
Tipos de agua	Acuarios	Bélgica	(De Jonckheere, 1979)
	Agua dulce	Antártida	(Brown y col., 1982)
	Agua corriente	Jamaica	(Lorenzo-Morales y col., 2005a)
	Agua corriente	Islas Canarias (España)	(Lorenzo-Morales y col., 2005c)
	Agua corriente	Taiwan	(Kao y col., 2013b)
	Agua embotellada	España	(Varela Mato y col., 1987)
	Agua de lluvia	Jamaica	(Lorenzo-Morales y col., 2005a)
	Agua de mar	Norte de España	(Arias Fernandez y col., 1989)
	Agua de mar	Jamaica	(Lorenzo-Morales y col., 2005a)
	Agua de mar	Islas Canarias, España	(Lorenzo-Morales y col., 2005c)
	Aguas superficiales	Irán	(Mahmoudi y col., 2012)
	Aguas termales	Taiwan	(Kao y col., 2012, 2013b)
	Aguas termales	Irán	(Solgi y col., 2012)
	Canales	Alejandro, Egipto	(Sadaka y col., 1994)
	Canales	Irán	(Rahdar y col., 2012)
	Embalses	Aragón, España	(Garcia y col., 2013)
	Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)	Israel	(Kahane y col., 2004)
	EDAR	Navarra, España	(Garcia y col., 2011)
	EDAR	Reino Unido	(Gaze y col., 2011)
	EDAR (lodos)	Suráfrica	(Schroeder y col., 2001)
	Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP)	Alemania	(Hoffmann y Michel, 2001)
	ETAP	Aragón, España	(Garcia y col., 2013)
	ETAP	Bulgaria	(Tsvetkova y col., 2004)
	ETAP	París, Francia	(Thomas y col., 2008)
	ETAP	Polonia	(Łanocha y col., 2009)
	ETAP	Reino Unido	(Kilvington y col., 2004)
	ETAP	Suiza	(Corsaro y col., 2010)
	Grifo	Hong Kong	(Boost y col., 2008)
	Grifo	Corea	(Jeong y Yu, 2005)
	Lagos	Malasia	(Onichandran y col., 2013)
	Manantiales	España	(Varela Mato y col., 1987)
	Piscina	Brasil	(Alves D de y col., 2012, Caumo y Rott, 2011)
	Piscina	Irán	(Rahdar y col., 2012)
	Piscina	Malasia	(Init y col., 2010)
Piscina	Suiza	(Gianinazzi y col., 2010)	
Reservorios agua potable	Irán	(Yousuf y col., 2013b)	
Río	Taiwan	(Kao y col., 2013b)	
Río	Virginia, EEUU	(Ettinger y col., 2003)	
Spa	Noroeste de España	(Penas Ares y col., 1994)	

Tabla 4 continuación. Algunos ejemplos de *Acanthamoeba* en diferentes muestras ambientales.

	Tipo de muestra	Localización	Referencia
Tipos de suelos	Arena de la playa	Islas Canarias (España)	(Lorenzo-Morales y col., 2005b)
	Biofilm	Taiwán	(Chang y Wu, 2010)
	Compost	Suiza	(Conza y col., 2013b)
	Filosfera de Bromeliaceae (superficie de las hojas)	Brasil	(Landell y col., 2013)
	Fondo marino contaminado por vertidos de agua residual	Philadelphia (EEUU)	(Nerad y col., 1995)
	Rizosfera de <i>Eichornia crassipes</i> (Jacinto de agua)	Méjico	(Ramirez y col., 2010)
	Rizosfera del maíz	Hungría	(Orosz y col., 2013)
	Salobral	Nueva York (EEUU)	(Sawyer y col., 1977)
	Sedimento de agua dulce	Arizona (EEUU)	(De Jonckheere, 2007)
	Sedimentos oceánicos	Corea	(Liu y col., 2006)
	Sedimento oceánico	Nueva York (EEUU)	(Sawyer y col., 1977)
	Suelo	Antártida	(Brown y col., 1982)
	Suelo	Brasil	(Alves D de y col., 2012)
	Suelo	Irán	(Rahdar y col., 2012)
Suelo costero	Mar del Norte	(Munson y Paget, 2006)	
Dispositivos médicos y productos sanitarios	Aire acondicionado	Chile	(Astorga y col., 2011)
	Aparatos de diálisis	Egipto	(Hassan y col., 2012)
	Lentillas y estuches	Nueva Zelanda	(Gray y col., 1995)
	Lentillas y estuches	Corea	(Jeong y Yu, 2005)
	Lentillas y estuches	Reino Unido	(Larkin y col., 1990)
	Lentillas y estuches	Brasil	(Pens y col., 2008)
	Lentillas y estuches	Filipinas	(Rivera y Adao, 2009)
	Lentillas y estuches	Islas Canarias (España)	(Martin-Navarro y col., 2008)
	Unidades dentales	Canadá	(Barbeau y Buhler, 2001)
	Unidades dentales	Egipto	(Hassan y col., 2012)
Unidades dentales	Túnez	(Trabelsi y col., 2010)	
Animales	Aves (Tucán y Tragopán)	EEUU	(Visvesvara y col., 2007a, 2010)
	Macaco	EEUU	(Westmoreland y col., 2004)
	Peces de agua dulce	República Checa	(Dykova y Lom, 2004)
	Perros	Brasil	(Carlesso y col., 2014)
	Saurios	Austria y España	(Madrigal Sesma, 1988, Walochnik y col., 1999)

#### 1.4. INFECCIONES, PATOGENIA Y TRATAMIENTO

*Acanthamoeba* es un protozoo de vida libre que no necesita de ningún hospedador para completar su ciclo biológico pero que, si se dan las condiciones apropiadas, puede infectar a distintos hospedadores (mamíferos, peces, reptiles, aves) (Dykova y Lom, 2004, Khan, 2009, Visvesvara y col., 2007a, Visvesvara y col., 2007b, Walochnik y col., 1999). En el hombre *Acanthamoeba* produce fundamentalmente dos patologías diferentes, una de ellas la infección de la córnea, queratitis amebiana (QA) y la otra, una infección del Sistema Nervioso Central (SNC) denominada Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA). *Acanthamoeba* produce además infecciones cutáneas muchas veces relacionadas con la EGA (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). *Acanthamoeba* se ha aislado también en una infección ótica (Marciano-Cabral y Cabral, 2003) y en un injerto de hueso narcotizado de un paciente con osteomielitis mandibular (Borochoviz y col., 1981).

Además de *Acanthamoeba* existen otras AVL que pueden causar patología en el hombre como *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*. En la Tabla 5 se recogen las principales características de las patologías causadas por dichas amebas además de *Acanthamoeba*.

**TABLA 5. Comparación de la infecciones producidas por las principales amebas de vida libre patógenas para el hombre.** PHMB: Polihexametileno-biguadina. Modificada de Visvesvara y col. (2007b).

	<i>Acanthamoeba</i>		<i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
	Otras patologías	Queratitis		
<b>Ciclo biológico</b>	Dos estados: trofozoito y quiste	Dos estados: trofozoito y quiste	Dos estados: trofozoito y quiste	Tres estados: trofozoito, quiste y forma flagelada
<b>Características morfológicas</b>	Núcleo vesiculoso y acantopodos en el trofozoito. Quiste con doble pared y poros		Núcleo o núcleos vesiculosos, forma ameboidea con movimientos de "araña" en cultivo. Quistes con pared triple.	Núcleo vesiculoso, trofozoito con movimiento "limacoide" (de babosa). Quiste con poros en la superficie
<b>Cultivo <i>in vitro</i></b>	Axénico, agar tapizado con bacterias, sobre cultivos celulares. Temperatura óptima de cultivo: 37°C en el caso de EGA y 30°C en el de queratitis		Cultivo axénico o sobre cultivos celulares. Temperatura óptima de cultivo: 37°C	Axénico, agar tapizado con bacterias, sobre cultivos celulares. Temperatura óptima de cultivo $\geq$ 37°C
<b>Enfermedad</b>	EGA, lesiones cutáneas, pulmonía, infección de los senos nasales o infección cutánea.	Queratitis amebiana	EGA, lesiones cutáneas, pulmonía, infección de los senos nasales	Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP)
<b>Tiempo de incubación</b>	Semanas a meses	Pocos días	Semanas a meses	Pocos días
<b>Grupo de riesgo</b>	Población con algún tipo de inmunodeficiencia: VIH+/SIDA, trasplantados, con terapia inmunosupresora, etc.	Portadores de lentes de contacto con prácticas higiénicas deficientes tales como el uso del agua corriente para el lavado de las lentes, inmersión de la cabeza o ducharse con las lentes; personas con traumatismos oculares	Población inmunocompetente (especialmente niños y ancianos) y con algún tipo de inmunodeficiencia. Población latino-americana	Población con historia de baño en aguas recreacionales templadas. Generalmente niños y jóvenes
<b>Manifestaciones clínicas</b>	Dolor de cabeza, tortícolis, cambios en el comportamiento, coma.	Dolor intenso en el ojo, fotofobia y lagrimeo.	Dolor de cabeza, náuseas, convulsiones, formación de nódulos en las infecciones cutáneas.	Dolor de cabeza, tortícolis, convulsiones, coma.
<b>Desarrollo de la enfermedad</b>	Curso subagudo poco doloroso, fase aguda fulminante en semanas	Penetración de los trofozoítos en la córnea, aparición de anillo estromal por la infiltración de leucocitos PMN	Curso subagudo poco doloroso, fase aguda fulminante en pocas semanas	Fulminante. Sin tratamiento, la esperanza de vida es de 1 a 2 semanas
<b>Reacción humoral</b>	Variable. Se desconoce su eficacia en la protección	La presencia de IgA en la superficie corneal parece estar relacionada con protección	Generalmente fuerte aunque se desconoce su eficacia en la protección	Normalmente baja aunque los títulos suelen aumentar cuando la infección se cronifica
<b>Prognosis</b>	Mala. Suele diagnosticarse <i>post-mortem</i> . Pocos casos de supervivientes	Excelente con terapia adecuada. En algunos casos es necesario trasplante de córnea.	Mala. Suele diagnosticarse <i>post-mortem</i> . Pocos casos de supervivientes	Buena si se diagnostica a los pocos días de la infección. Diagnósticos tardíos <i>exitus letalis</i>
<b>Tratamiento</b>	Pentamidina, compuestos azólicos, flucitosina, sulfadiazina	PHMB, clorhexidina.	Pentamidina, compuestos azólicos, flucitosina, sulfadiazina	Amfotericina B intratecal, miconazol

### 1.4.1. Queratitis amebiana

El primer caso de queratitis amebiana por *Acanthamoeba* se describió en 1973 (Jones y col., 1975) y de manera gradual los casos fueron aumentando hasta 1985 año a partir del cual el incremento de casos fue muy marcado asociado al aumento de la popularidad del uso de lentes de contacto blandas (Lorenzo-Morales y col., 2013, Visvesvara y col., 2007b).

La queratitis por *Acanthamoeba* se caracteriza por una inflamación de la córnea (Figura 11, Figura 12) produciendo dolor ocular, hiperemia<sup>2</sup>, fotofobia o edema (Visvesvara y col., 2007b). Al comienzo de la patología puede observarse queratopatía punteada<sup>3</sup>, pseudodendritas, infiltrados corneales y uveítis<sup>4</sup>. Puede aparecer también limbitis<sup>5</sup> tanto en los primeros estadios como en patologías cronificadas. Los abscesos, escleritis<sup>6</sup>, granuloma, cataratas o infecciones microbianas secundarias son comunes cuando la patología se agrava (Durán de la Colina, 1998, Garner, 1993, Vemuganti y col., 2004). Normalmente la infección se produce en un solo ojo, pero se han descrito casos de infecciones bilaterales (Visvesvara y col., 2007b).

En el desarrollo de la queratitis por *Acanthamoeba* pueden identificarse las siguientes etapas (Clarke y col., 2012, Garner, 1993, Vemuganti y col., 2004, Visvesvara y col., 2007b):

1. Adhesión epitelial y descamación: la secreción de sustancias citolíticas (fosfolipasas, serín- proteasas, cistein-proteinasas, metaloproteinasas, activadores del plasminógeno...) por parte de *Acanthamoeba* y su acción fagocítica producen una rápida

---

<sup>2</sup> **Hiperemia**: exceso de sangre en la parte blanca de los ojos (esclerótico).

<sup>3</sup> **Queratopatía punteada**: pequeñas lesiones dispersas diseminadas por la superficie de la córnea debida a la muerte de las células superficiales de la córnea.

<sup>4</sup> **Uveítis**: inflamación de la úvea, lámina intermedia del ojo situada entre la esclerótica y la retina.

<sup>5</sup> **Limbitis**: inflamación del limbo que es la zona circular, ligeramente sobreelevada, que corresponde a la línea de transición entre la córnea y la esclera.

<sup>6</sup> **Escleritis**: inflamación dolorosa de la esclerótica (parte blanca del ojo).

descamación de las células del epitelio corneal muchas de las cuales entran en apoptosis.

La adhesión de *Acanthamoeba* al epitelio depende, entre otros factores, del estado fisiológico de la córnea. En ensayos *in vivo* en animales con la córnea intacta no pudo establecerse la patología (Nieder Korn y col., 1999) por lo que un trauma previo de la córnea parece facilitar la adhesión. El proceso de invasión comienza cuando una proteína de unión a manosa (MBP) de 136 kDa de la ameba reconoce las glicoproteínas con manosa de la superficie del tejido epitelial (Clarke y Nieder Korn, 2006, Garate y col., 2006). La expresión de estas glicoproteínas reactivas para *Acanthamoeba* es 1.8 veces mayor en el tejido dañado que en el sano lo que facilita la unión y, por tanto, la invasión (Jaison y col., 1998).

2. Invasión del estroma: tras la adhesión mediada por las MBP, *Acanthamoeba* produce un efecto citopático que incluye la muerte de las células del hospedador, la degradación del epitelio de la membrana basal y de la matriz estromal penetrando así hasta las capas más internas de la córnea, produciendo un infiltrado en forma de anillo característico de esta patología (Figura 13). Dicho anillo está formado principalmente por neutrófilos.

La interacción parásito-hospedador mediada por MBP produce la secreción de metaloproteinasas y serinproteinasas que actúan conjuntamente produciendo el efecto citopático: metaloproteinasa citotóxica (P3), o MIP-133 (una proteinasa citotóxica de 133 kDa -*mannose-induced protein*-). Por tanto, la transducción de la señal mediada posiblemente por el dominio citoplasmático de MBP juega un papel fundamental en la regulación de la secreción de proteinasas citotóxicas dependientes de contacto. Por otro lado, la liberación de la serin proteasa amebiana (P2) es independiente de esta unión (Panjwani, 2010).

3. Neuritis: es la inflamación del nervio óptico que puede originar pérdida de visión parcial o completa.
  
4. Necrosis estromal: la pérdida de queratocitos se debe tanto a la apoptosis de los mismos como a los procesos necróticos/fagocíticos propios del parásito. La muerte de las células inflamatorias también parece estar asociada a procesos apoptóticos (Vemuganti y col., 2004).

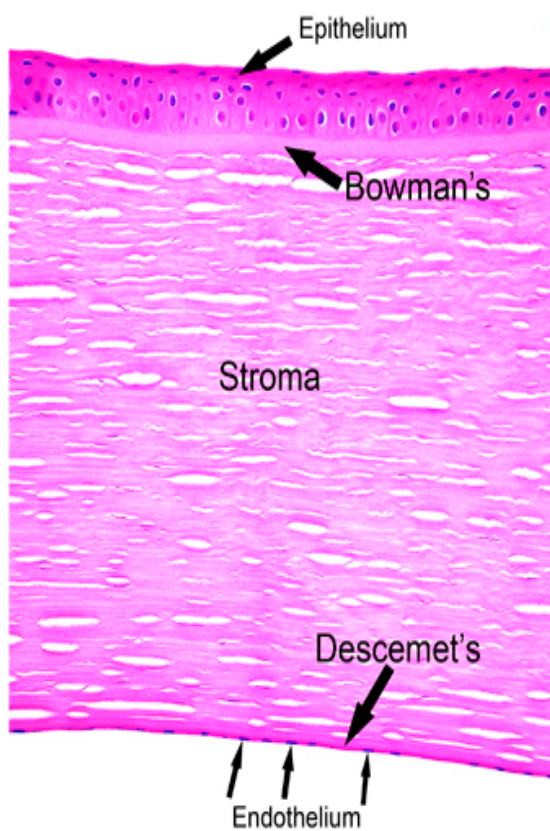


FIGURA 12. Histología de la córnea. Imagen tomada de Meeney y Mudhar (2013)

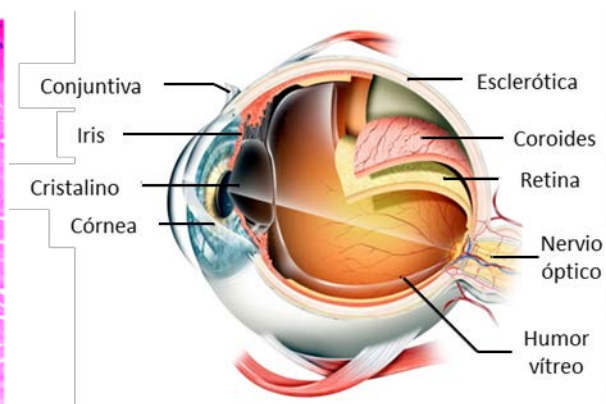


FIGURA 11. Anatomía del ojo humano. Tomada de [www.drsofer.com](http://www.drsofer.com).



FIGURA 13. Observación de la córnea con una lámpara de hendidura o biomicroscopio. Puede apreciarse el infiltrado en forma de anillo típico de queratitis por *Acanthameoba*. Imagen tomada de Visvesvara y col. (2007b)

#### 1.4.1.1. Factores de riesgo

El factor de riesgo fundamental es el uso inadecuado de las lentes de contacto. Dentro del uso incorrecto destacan los siguientes factores (Visvesvara y col., 2007b):

- Exceder el tiempo de uso recomendado de las lentes de contacto.
- Falta de higiene personal.
- Uso de soluciones salinas caseras o agua corriente en vez de los líquidos comerciales.
- Limpieza inapropiada de las lentes de contacto, como por ejemplo no frotar las lentes con los desinfectantes.
- Falta de limpieza del estuche de las lentes de contacto.
- Usar las lentes de contacto en actividades acuáticas como nadar, bucear o ducharse.

Además del riesgo asociado al uso de las lentes de contacto se han descrito otros factores dependientes del hospedador. En estudios realizados en India, el factor de riesgo más común para el desarrollo de la QA parece ser el traumatismo previo de la córnea y la posterior exposición a agua contaminada (Sharma y col., 2000).

La composición de las lágrimas del hospedador parece encontrarse también entre los factores de riesgo/protección. Existen estudios que ponen de manifiesto que, además de la acción protectora de las IgA propias de las lágrimas frente *Acanthamoeba* (Campos-Rodriguez y col., 2004) deben existir otros factores que reducen tanto la adherencia de este protozoo (Alsam y col., 2008) como su efecto citopático (Cao y col., 2008).

#### 1.4.1.2. Tratamiento

Para el tratamiento de la queratitis se han utilizado una gran variedad de principios activos como clorhexidina, polihexametil biguadina, isetionato de propamidina, isetionato de dibromopropamidina, neomicina, paramomicina, polimixina B,

clotrimazol, ketoconazol, miconazol e itraconazol (Schuster y Visvesvara, 2004a). Brolene® es una formulación comercial de isetionato de propamidina y dibromopropamidina efectiva para el tratamiento de las infecciones por *Acanthamoeba* aunque presenta toxicidad y desarrollo de resistencias. Se han ensayado *in vitro* otros compuestos de diamidinas, maganinas sintéticas con nitrato de plata, compuestos de imidazol y triazol, azitromicina, fenotiacinas y povidona iodada aunque su actividad no está claramente definida. En este sentido, en un estudio realizado con voriconazol, un derivado triazólico, sobre 4 aislados clínicos de *Acanthamoeba* se inhibió su crecimiento pero, una vez eliminado el principio activo del medio, las amebas se recuperon (Schuster y Visvesvara, 2004b). Por otro lado, la miltefosina, una dextadecilfosfolina, ha demostrado actividad amebicida (Schuster y col., 2006, Walochnik y col., 2002).

A pesar de que muchos de estos principios presentan actividades amebicidas, el tratamiento de elección está restringido a gluconato de clorhexidina, polihexametileno-biguanida (PHMB) y diamidinas en monoterapia o combinada, con una prognosis muy buena (Seal, 2003).

En los primeros estadios de la QA es recomendable un tratamiento combinado (diamidina más biguanida) para lograr una rápida lisis de los trofozoítos, y evitar que estos reviertan a formas quísticas, más resistentes. Durante las primeras 48 horas se aconseja la aplicación de ambos principios cada hora y en las siguientes 72 horas, una gota cada hora solo durante el día. A partir de este momento la dosis baja a una gota cada tres horas para evitar la aparición de fenómenos tóxicos asociados a las diaminas. La frecuencia de la instilación puede reducirse a cuatro veces al día en 3-4 semanas pero debe mantenerse al menos 8 semanas más desde la resolución de la inflamación. El tratamiento medio es, por tanto, de unos 6 meses (Pérez-Irezábal y col., 2005).

El tratamiento quirúrgico, con la excepción de la perforación corneal que requiere intervención urgente, se limita a corregir los efectos

residuales como cicatrices corneales o astigmatismo (Pérez-Irezábal y col., 2005).

La técnica del *Cross linking* también se ha utilizado en el tratamiento de *Acanthamoeba*. Esta técnica combina la aplicación de riboflavina y luz ultravioleta con el fin de endurecer la córnea. En los pacientes con queratitis se ha observado que tras la fotoactivación de la riboflavina por procesos de oxidación se produce daño en el ADN de *Acanthamoeba* retrasando la destrucción corneal (Alio y col., 2013).

#### **1.4.2. Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)**

La EGA por *Acanthamoeba* es una infección crónica del SNC con progresión muy lenta (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Los primeros indicios de que *Acanthamoeba* podía causar patología en el hombre datan de 1958 durante los ensayos de la vacuna de la polio. En las placas de cultivo celulares utilizadas para la preparación de dicha vacuna se observaron placas de lisis celular que se achacaron al virus debido a que la inoculación del sobrenadante en ratones y monos producía encefalitis. Posteriormente dichas zonas de lisis se asociaron con *Acanthamoeba* (Culbertson y col., 1959, Culbertson y col., 1958) al observarse tanto quistes como trofozoítos en los cultivos. La presencia de estos protozoos junto con los síntomas en animales llevaron a Culbertson y col. (1958) a postular el posible papel de *Acanthamoeba* como patógeno humano lo que quedó confirmado con los casos de EGA que se describieron los años siguientes en África, América, Australia y Europa (Bhagwandeem y col., 1975, Butt, 1966, Callicott y col., 1968, Cervá y Novák, 1968, Fowler y Carter, 1965, Jager y Stamm, 1972, Martínez, 1980, Patras y Andujar, 1966, Willaert y Stevens, 1976).

Se han descrito diferentes vías de infección de *Acanthamoeba*, por inhalación a través de las fosas nasales o pulmón o penetrando por lesiones cutáneas. La llegada al SNC puede ser o bien por ruta hematogena a partir de otra infección (pulmonar o cutánea) o a través del neuroepiteio olfativo (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

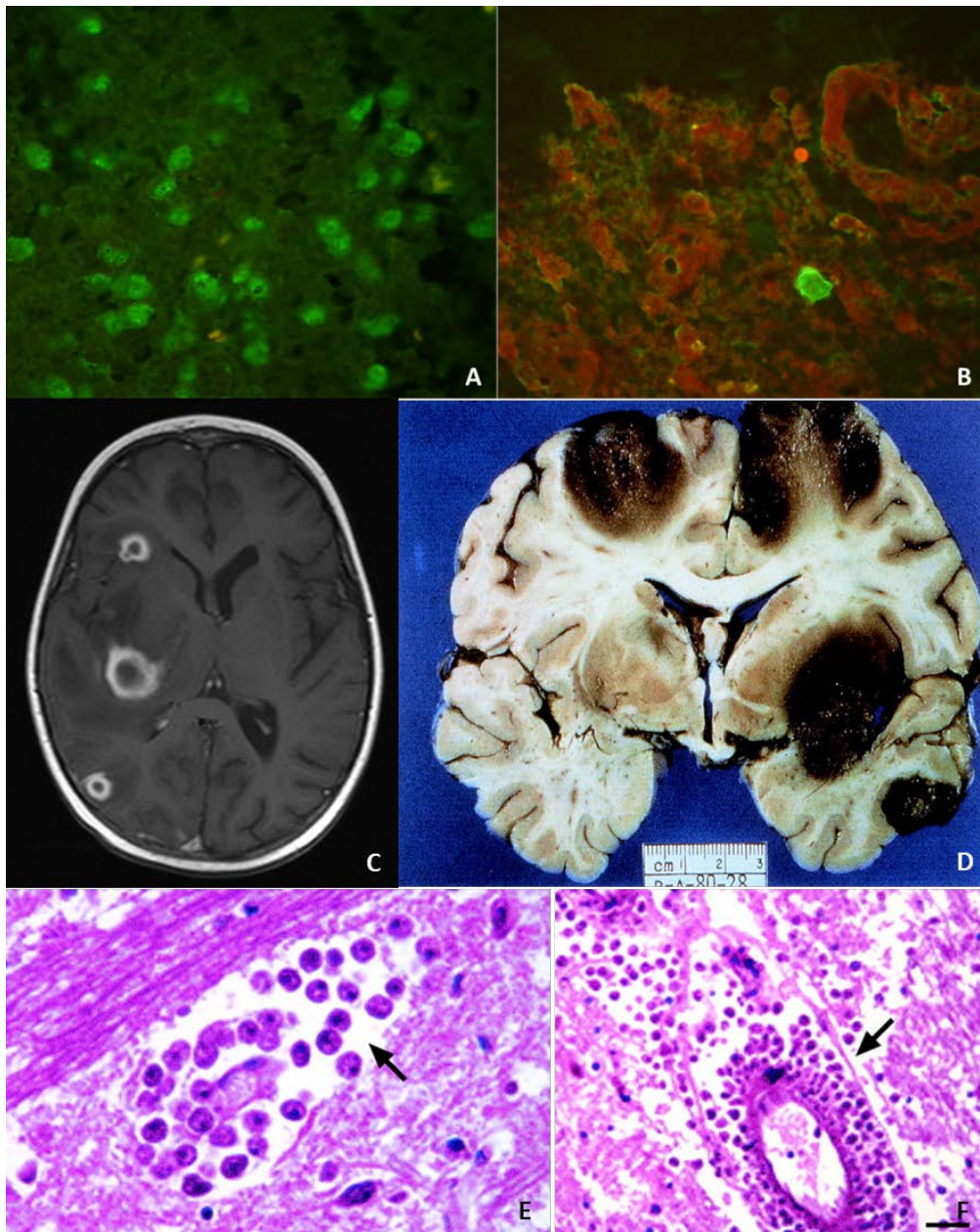
Los signos y síntomas de la EGA incluyen cambios de personalidad, dolor de cabeza, febrícula, náuseas, vómitos, letargia, diplopía, hemiparesis, convulsiones, pérdida de consciencia y coma. En algunos pacientes se ha descrito también perlesía del tercer y sexto par craneal y paralización facial asimétrica. Debido a que estos síntomas y signos son similares a la leptomeningitis y a las meningitis bacterianas y víricas su diagnóstico suele retrasarse lo que conlleva la muerte de los pacientes. En estudios de fisiopatología del SNC a partir de autopsias de pacientes con EGA se puede observar edema, encefalomacia<sup>7</sup> además de zonas hemorrágicas múltiples y necróticas. Tanto en los hemisferios, como en el tronco cefálico y el cerebelo pueden aparecer dichas zonas de infartos hemorrágicos además de células gigantes multinucleadas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Visvesvara, 2013) (Figura 14).

La patogénesis de la EGA por *Acanthamoeba* está íntimamente relacionada con el estado inmunológico del paciente; en individuos inmunocompetentes se pueden observar granulomas alrededor de las amebas mientras que en las personas inmunocomprometidas estos granulomas son escasos o inexistentes (Martinez, 1982). Por otro lado, la causa de la aparición de zonas necróticas no está bien definida, puede deberse a la acción directa de los trofozoítos sobre el tejido o a la inducción de citoquinas pro-inflamatorias como la interleukina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) o la interacción de ambas rutas (Marciano-Cabral y col., 2000).

En casos de inmunosupresión puede producirse la diseminación de *Acanthamoeba* a órganos tan dispares como hígado, riñón, tráquea o glándulas adrenales (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

---

<sup>7</sup> **Encefalomalacia:** Ablandamiento o pérdida de tejido cerebral.



**FIGURA 14. Encefalitis Granulomatosa Amebiana por *Acanthamoeba*.** Cortes histológicos teñidos por Inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos policlonales: A: corte histológico de encéfalo de ratón experimentalmente infectado con *Acanthamoeba* USP-GM-A3. B: corte histológico de encéfalo de paciente con EGA por *Acanthamoeba*, puede distinguirse un trofozoito color verde. C: imagen de Resonancia Magnética en la que pueden observarse múltiples abscesos con tejido necrotizado alrededor, imagen tomada de Maritschnegg y col. (2011). D: sección coronal de los hemisferios cerebrales con necrosis cortical y subcortical de un caso humano de EGA, imagen tomada de Martinez (1982). E y F: tinción de Hematoxilina-Eosina sobre corte de tejido cerebral, los trofozoitos están señalados con flechas negras, imagen tomada de Marciano-Cabral y Cabral (2003)

#### 1.4.2.1. Factores de riesgo

La EGA por *Acanthamoeba* se diagnostica fundamentalmente en pacientes con enfermedades crónicas, individuos debilitados, con algún tipo de inmunosupresión como VIH positivos, con terapia antibacteriana de amplio espectro, tumores, Lupus Eritematoso Sistémico, diabetes, fallo renal, cirrosis, tuberculosis, úlceras epidérmicas o enfermedad de Hodgkin's (Feingold y col., 1998, Harwood y col., 1988, Jager y Stamm, 1972, Koide y col., 1998, Martinez, 1982, Visvesvara, 2013). Aun así se han descrito casos de EGA en niños y adultos inmunocompetentes (Bhagwandeem y col., 1975, Ofori-Kwakye y col., 1986, Sangruchi y col., 1994, Singhal y col., 2001, Walochnik y col., 2008).

Existen también factores que predisponen a la EGA tales como el alcoholismo, drogadicción, tratamiento con esteroides, quimioterapia antitumoral, radioterapia o trasplante de órganos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

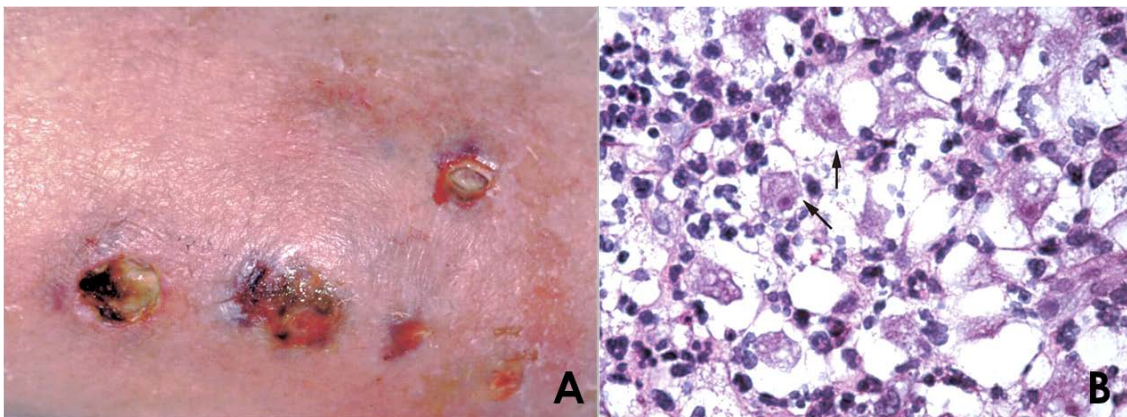
#### 1.4.2.2. Tratamiento

El tratamiento de la EGA es complicado debido a que i) los síntomas no son específicos y puede confundirse con infecciones víricas o bacterianas, ii) no existe una prueba diagnóstica infalible y iii) la EGA por AVL no es una patología muy conocida por los clínicos por lo que el diagnóstico suele ser *post-mortem* (Visvesvara, 2013). Aun así cuando el diagnóstico se realiza *ante-mortem* el tratamiento con una combinación de diferentes antimicrobianos como pentamidina, fluconazol, 5-fluorocitosina y sulfadiazinas tiene buena prognosis, aumentando la supervivencia de los pacientes (Visvesvara, 2013). También se ha utilizado con éxito la miltefosina en un paciente austriaco (Aichelburg y col., 2008). Debido a que muchos de estos fármacos tienen efectos adversos graves el tratamiento de la EGA debe suspenderse en muchos casos (Visvesvara y Maguire, 2006).

### 1.4.3. Acanthamebiasis cutánea

Las infecciones cutáneas por *Acanthamoeba* se producen fundamentalmente en pacientes con SIDA con o sin afección del SNC (Casper y col., 1999, Galarza y col., 2009, Murakawa y col., 1995) aunque también se han descrito casos en personas VIH negativas pero con EGA, con terapia inmunosupresora tras trasplante o con desordenes inmunológicos (Galarza y col., 2009, Gee Sn Fau - Rothschild y col., 2011, Slater y col., 1994, Steinberg y col., 2002, Visvesvara y col., 1983).

Las infecciones cutáneas se caracterizan por la aparición de úlceras en la piel o nódulos eritematosos. En los primeros estadios de la infección aparecen pápulas con secreción purulenta que desemboca en úlceras endurecidas que no cicatrizan (Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Paltiel y col., 2004) (Figura 15).



**FIGURA 15. Acanthamebiasis cutánea.** A: Lesiones ulceradas en el brazo de un paciente con infección diseminada por *Acanthamoeba*. Nódulos de la piel que se caracterizan por un oscurecimiento central, costras y úlceras profundas, con bordes endurecidos. B: Biopsia de absceso cutáneo, en ella se observan varios trofozoitos de *Acanthamoeba* (señalados por flechas) en medio de restos necróticos (tinción de hematoxilina-eosina, aumento original,  $\times 160$ ). Imágenes tomadas de Steinberg y col. (2002)

La aparición de úlceras producidas por *Acanthamoeba* puede ser una manifestación de una infección por dicho protozoo en otro órgano que ha diseminado por vía hematogena o bien, puede ser el primer foco de la infección y de ahí diseminar a otros órganos (Friedland y col., 1992,

Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Murakawa y col., 1995, Tan y col., 1993) (Figura 10).

Las lesiones histológicas producidas por *Acanthamoeba* son similares a las producidas por algunos hongos, virus, micobacterias o aquellas producidas por cuerpos extraños (Friedland y col., 1992) y se caracterizan por un foco de tejido necrotizado rodeado por células inflamatorias, vasculitis y la presencia de quistes y trofozoítos (Chandrasekar y col., 1997, Galarza y col., 2009, Paltiel y col., 2004).

Debido a la similitud con otras patologías cutáneas, se recogen en la bibliografía un número elevado de diagnósticos erróneos (

Tabla 6).

**TABLA 6. Casos de Acanthamebiasis cutánea mal diagnosticados.**

Diagnóstico erróneo	Tipo de microorganismo	Referencia
<i>Blastomyces dermatiditis</i>	Levadura	(Tan y col., 1993)
<i>Rhinosporidium seeberi</i>	Protozoo	(Sison y col., 1995)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hongo	(Sison y col., 1995)
<i>Prototheca wickerhamii</i>	Alga	(Sison y col., 1995)
“Enfermedad por araño de gato” ( <i>Bartonella</i> spp.)	Bacteria: Bacilo gramnegativo	(Sison y col., 1995)
Angiostomosis bacilar ( <i>Bartonella</i> spp.)	Bacteria: Bacilo gramnegativo	(Khalife y col., 1994)
<i>Penicillium marneffeii</i>	Hongo	(Casper y col., 1999)
Sarcoma de Kaposi	Tumor maligno causado por el Virus del sarcoma de Kaposi	(Chandrasekar y col., 1997)
Cytomegalovirus	Virus	(Teknos y col., 2000)
Mycobacterias atípicas/ dermatosis neutrofilica	Mycobacteria	(Gee Sn Fau - Rothschild y col., 2011)

#### 1.4.3.1. Tratamiento

Para el tratamiento de la acanthamebiasis cutánea no existe una pauta establecida aunque la tendencia es usar politerapia. Debido a que la Acanthamebiasis cutánea suele desembocar o ir precedida de EGA el tratamiento suele ser sistémico (véase epígrafe 1.4.2.2) acompañado de aplicaciones tópicas de gluconato de clorhexidina y cremas de ketoconazol (Visvesvara, 2013).

#### 1.4.4. Inmunología

El papel exacto que desempeña el sistema inmune en la respuesta frente a *Acanthamoeba* no está del todo claro si bien es cierto que la exposición a *Acanthamoeba* da lugar a una respuesta humoral como demuestran diferentes estudios en población sana (da Rocha-Azevedo y col., 2009, Marciano-Cabral y col., 2000). Uno de estos estudios de seroprevalencia en población asintomática en Nueva Zelanda mostró que el 100% de las muestras estudiadas eran positivas frente a *Acanthamoeba* con títulos entre 20 y 80 (Cursons y col., 1980). Otro estudio similar en la República Checa realizado por Cerva (1989) detectó que un 52% de los pacientes estudiados eran positivos por técnicas de hemaglutinación indirecta con títulos superiores a 640. Alizadeh y col. (2001) utilizando técnicas de ELISA detectaron niveles de IgG sérica similares en población sana y pacientes de QA mientras que estos últimos mostraron una disminución de las IgA en lágrimas. A pesar de que los porcentajes de exposición varíen entre países y técnicas utilizadas, todos ellos demuestran la estrecha relación entre *Acanthamoeba* y el hombre.

Por otro lado, la prevalencia de EGA y QA es muy baja (Marciano-Cabral, 2009) a pesar de que la presencia de *Acanthamoeba* es elevada en el medio ambiente (véase página 26). Aun así, *Acanthamoeba* se ha aislado de muestras nasofaríngeas de personas asintomáticas lo que pone de manifiesto el posible papel protector del sistema inmune (Cerva y col., 1973, Newsome y col., 1992, Rivera y col., 1986, Sadaka y col., 1994) a patologías transitorias autolimitadas. En esta línea, Chappell y col. (2001) postularon que aunque las infecciones oculares o del SNC son raras, las

infecciones de la mucosa respiratoria son probablemente muy comunes formando parte de los casos sin diagnosticar de sinusitis o infecciones pulmonares.

La protección frente a infecciones letales parece estar mediada tanto por el respuesta inmune innata como adquirida (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). En infecciones *in vivo* en modelo murino, el desenlace de la infección depende de la edad del animal, del estado inmunitario del hospedador, de la cepa de ratón, de la termotolerancia de la cepa inoculada así como la dosis infectiva y, por supuesto, la virulencia de la cepa (Marciano-Cabral y col., 2001).

#### **1.4.4.1. Sistema del complemento**

Se ha descrito que tras la infección por *Acanthamoeba* el sistema del complemento (SC) se activa pero se desconoce si dicha activación tiene un papel protector o, por el contrario, puede favorecer la infección (Toney y Marciano-Cabral, 1998). La activación del SC conlleva la aparición de las anafilotoxinas C3a y C5a que son mediadores de la respuesta inflamatoria y del daño tisular por lo que, en vez de participar de la eliminación de *Acanthamoeba* pueden estar favoreciendo la destrucción de tejido que conlleva la infección por este protozoo. Por otro lado, se ha descrito que la aparición de C3b favorece la opsonización de dicho protozoo y, por tanto su reconocimiento por las células fagocíticas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Toney y Marciano-Cabral, 1998).

En estudios *in vitro* se ha observado que la lisis de *Acanthamoeba* por el complemento parece depender de la cepa de *Acanthamoeba*. Así, cepas altamente patógenas resisten mejor la lisis que aquellas descritas como no patógenas (Toney y Marciano-Cabral, 1998). Esta resistencia puede deberse a que las cepas patógenas se unen más eficientemente a la proteína del complemento C1q que las cepas no patógenas. Es estudios realizados por Marciano-Cabral y Cabral (2003) han mostrado que la unión de la ameba a la C1q bloquea los sitios de unión para la proteína C1 que es el primer componente de la vía clásica de

activación del complemento evitando así dicha activación y, por tanto, la lisis celular. Por todo lo anterior este mecanismo de evasión del SC parece contribuir a que se establezca la infección y a la posterior diseminación de *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Toney y Marciano-Cabral, 1998).

#### 1.4.4.2. Respuesta humoral

El papel de los anticuerpos, al igual que sucede con el del complemento, no está perfectamente definido. Se ha descrito que los anticuerpos parecen prevenir la adhesión de *Acanthamoeba* a las células del hospedador, inhibir su motilidad o neutralizar sus factores citotóxicos (Cursons y col., 1980, Marciano-Cabral y Toney, 1998, Stewart y col., 1994). No obstante *Acanthamoeba* es también capaz de degradar tanto las IgG como las IgA gracias a diferentes serinproteasas (Kong y col., 2000).

Por otro lado, ensayos de inmunización de ratones con diferentes extractos antigénicos de *A. culbertsoni* (sobrenadante de cultivo, extracto bruto obtenido por congelación o sonicación) y por diferentes vías (nasal, intraperitoneal, oral o intravenosa) han mostrado una supuesta protección frente a *A. culbertsoni*. Sin embargo, si la fuente de antígeno se obtenía de otra especie de *Acanthamoeba*, la protección desaparecía (Culbertson y col., 1959, Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Respecto al papel protector de los anticuerpos en la QA es necesario diferenciar entre anticuerpos séricos y de secreción de mucosas (IgA). En un estudio *in vitro* en el que se inmunizaron intramuscularmente hámsteres chinos (*Mesocricetus auratus*) con diferentes antígenos, se observó una producción elevada de anticuerpos séricos pero al ser inoculados con *Acanthamoeba*, sí que desarrollaron QA demostrando la importancia de la IgA de las lágrimas y la falta de respuesta protectora de la IgG sérica en el caso de QA (Van Klink y col., 1997). Por otro lado, al cambiar la inmunización intramuscular por la oral en el mismo modelo así como en cerdos, sí que se observó protección (Leher y col., 1998a, Leher y col., 1998b). Los autores indicaron que esta

protección parecía estar, por tanto, relacionada con la producción de IgA. Es más, cuando se realizó una inmunoprotección pasiva con anticuerpos IgA monoclonales anti-*Acanthamoeba* en hámsteres, la protección frente a la QA fue elevada (Leher y col., 1999). Todos estos estudios parecen indicar que la respuesta inmune de mucosas con producción de IgA se muestra eficaz en la protección frente a *Acanthamoeba* antes de que la infección se haya establecido (Leher y col., 1998a). En esta línea, Alizadeh y col. (2001) postularon que la única inmunoglobulina que confería protección era la IgA secretada independientemente de los niveles séricos. Para ello estudiaron los niveles de IgG séricas totales y de IgA en las lágrimas de personas sanas y pacientes de QA observando que aunque los niveles séricos de IgG eran similares entre ambas poblaciones, los niveles de IgA se encontraban disminuidos en los pacientes de QA lo que confirmaba su hipótesis.

#### **1.4.4.3. Interacción *Acanthamoeba*- células del sistema inmune**

La primera respuesta celular ante una infección por *Acanthamoeba* consiste en una llegada masiva de linfocitos. Para que esta respuesta sea eficaz, es necesaria la presencia de citoquinas, anticuerpos y factores del complemento que faciliten la destrucción de *Acanthamoeba* por los linfocitos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Además de los linfocitos también aparecen en el foco de infección macrófagos que parecen tener un papel protector mayor aun que los linfocitos, tanto es así que son el componente celular principal que aparece en los granulomas que se forman alrededor de los quistes de *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral y Toney, 1998, Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

En diferentes estudios *in vitro*, se ha observado que la pre-activación de los macrófagos muestra una eficacia mayor en la destrucción de *Acanthamoeba* que los macrófagos no activados o que las líneas estables de los mismos. Para confirmar que la protección se debe a los macrófagos y no a las citoquinas que estos segregan, diferentes estudios *in vitro* han enfrentado *Acanthamoeba* a citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-

1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ ) en ausencia de los macrófagos observándose la ineficacia de las mismas (Marciano-Cabral y Toney, 1998, Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Así mismo, en ensayos *in vivo* con ratones, se observó que la pre-activación de los macrófagos con agentes inmunopotenciadores protegía a un 30-40% de los animales infectados con *Acanthamoeba* por vía nasal (Masihi y col., 1986).

La microglía, macrófagos del SNC, también presentan actividad amebicida (Marciano-Cabral y col., 2000). En diferentes estudios *in vitro* se ha observado que la microglía destruye a los trofozoitos de *Acanthamoeba* tanto por procesos fagocíticos como líticos, es más, se ha demostrado que dichas células en co-cultivo con *Acanthamoeba* expresan citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ ) que podrían participar en la patogénesis de este protozoo en el SNC (Marciano-Cabral y col., 2000, Shin y col., 2000, Shin y col., 2001). Al igual que ocurría con el SC, la respuesta de la microglía depende de la patogenicidad de la cepa a la que se enfrente. Shin y col. (2000) demostraron en ensayos *in vitro* que la microglía entraba en apoptosis con cepas virulentas pero no así con las cepas menos patogénicas. Todo ello indica que *Acanthamoeba* es capaz de inhibir a las células fagocíticas (macrófagos y microglía) contribuyendo a que se establezca la infección y a su posterior diseminación (Marciano-Cabral y col., 2000, Shin y col., 2000, Shin y col., 2001).

Los linfocitos T parecen tener un papel fundamental en el control de la acanthamebiasis pues en estudios en clones de células T de personas inmunocompetentes enfrentados a antígenos amebianos se observa una respuesta del tipo Th1 (Tanaka y col., 1994). Esto que sugiere que la baja incidencia de casos de acanthamebiasis con sintomatología aparente se debe a una respuesta inmunitaria de memoria mediada por los linfocitos T (Tanaka y col., 1994). En estudios posteriores se ha observado además que ciertos antígenos de *Acanthamoeba* similares a antígenos propios del hospedador activaban la producción de linfocitos T que, por reacción cruzada, acaban produciendo una respuesta

autoinmune en el SNC lo que, a su vez, desemboca en encefalomiелitis autoinmune (Massilamany y col., 2010, 2011).

### **1.4.5. Diagnóstico**

#### **1.4.5.1. Encefalitis Granulomatosa Amebiana**

El diagnóstico de la EGA en aquellos pacientes con sintomatología de infección del SNC puede realizarse por una observación microscópica en directo o con tinción tanto del Líquido Ceforraquídeo (LCR) como de su sedimento (da Rocha-Azevedo y col., 2009, Visvesvara, 2013). Se aconseja que el LCR se centrifugue a baja velocidad (250g) durante 10 minutos para evitar la lisis de los trofozoitos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Sin embargo, la observación en directo de estas muestras puede llevar a error debido a la similitud de los trofozoitos con los macrófagos por lo que se recomienda la realización de una tinción de Giemsa-Wright. Si se dispone de una citocentrífuga la tinción con hematoxilina-eosina (H&E), o tricrómico permite la observación de caracteres típicos de los trofozoitos como un nucleolo prominente, la vacuola contráctil y las vacuolas citoplasmáticas (Newsome y col., 1992).

El cultivo es otro método diagnóstico utilizado a partir de muestras de LCR, biopsias cerebrales, pulmonares o abscesos cutáneos siguiendo el protocolo descrito en el punto 1.2.7.1 (da Rocha-Azevedo y col., 2009, Visvesvara, 2013)

Los cortes de tejido procedente de biopsia pueden teñirse con H&E, Gram o Giemsa que, aunque no son tinciones específicas, permiten distinguir las amebas de los macrófagos según la morfología nuclear (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Sobre estos mismos cortes pueden realizarse técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos mono o policlonales (Figura 14).

Las técnicas de imagen como la tomografía computarizada o la resonancia magnética pueden alertar de alteraciones en el SNC pero no son una buena herramienta diagnóstica pues no permiten el diagnóstico diferencial con otras patologías del SNC (da Rocha-Azevedo y col., 2009).

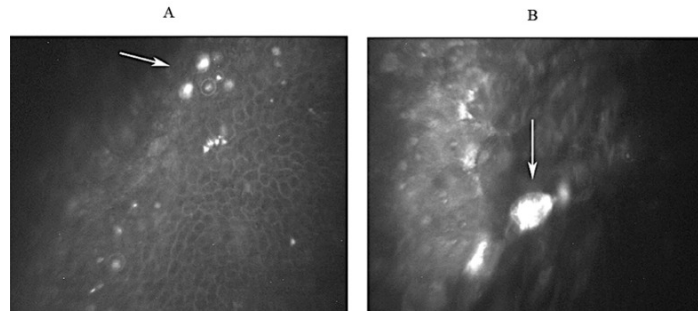
Existen también diferentes métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la EGA (da Rocha-Azevedo y col., 2009, Laummaunwai y col., 2012, Qvarnstrom y col., 2006, Visvesvara, 2010, Yang y col., 2013). Algunas de ellas han sido diseñadas en formato múltiple (*multiplex* PCR) lo que permite distinguir entre las AVL que causan patología en el SNC.

#### 1.4.5.2. Queratitis amebiana

La QA es difícil de diagnosticar debido a que su sintomatología es similar a la producida por el herpes simplex, *Pseudomonas aeruginosa* o infecciones fúngicas, lo que retrasa el tratamiento. Las muestras tomadas con torunda de la conjuntiva o la córnea no son buenas para el cultivo ni para la PCR; las muestras más apropiadas son los raspados corneales o las biopsias corneales que además pueden utilizarse para tinción de cortes histológicos (da Rocha-Azevedo y col., 2009, Visvesvara, 2013). Tanto el cultivo como las técnicas de PCR se realizan de la misma manera que en el diagnóstico de EGA (ver punto 1.4.5.1).

El cultivo de las lentes de contacto en caso de sospecha de QA puede alertar de la presencia de *Acanthamoeba* además de suponer una técnica no invasiva. Aun así no debe tomarse como un diagnóstico definitivo ni estudiarse de forma aislada sin tener en cuenta la sintomatología del paciente pues existen casos descritos de QA con lentes de contacto cuyo cultivo fue negativo y viceversa, esto es, lentes de contacto positivas para *Acanthamoeba* sin QA en sus dueños (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

El diagnóstico de QA puede realizarse utilizando también técnicas no invasivas como el examen de la córnea con el microscopio confocal *in vivo* (Villani y col., 2014, Zhang y col., 2014).



**FIGURA 16.** Imágenes de microscopía confocal *in vivo* ( $\times 500$ ) de un caso de QA. A: la flecha señala un quiste de *Acanthamoeba*. B: la flecha señala un torfozoito. Imagen tomada de Rezaei Kanavi y col. (2013)

## 1.5. ACANTHAMOEBA: CABALLO DE TROYA

Existen numerosas evidencias de la interacción de *Acanthamoeba* con otros organismos como virus, bacterias, hongos e incluso protozoos. Esta interacción puede ser simplemente simbiótica o llevar a la destrucción de *Acanthamoeba* o del otro organismo.

### 1.5.1. Interacción *Acanthamoeba*-bacterias

Las interacciones entre *Acanthamoeba* y las bacterias son muy complejas y variadas dependiendo del mecanismo de reconocimiento entre las mismas y la internalización de las bacterias (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

*Acanthamoeba* se describe como un protozoo bacteriófago capaz de controlar las poblaciones bacterianas en el suelo (Rodríguez-Zaragoza, 1994) gracias a la producción de enzimas bacteriolíticas que degradan la pared bacteriana (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). En los ambientes acuáticos *Acanthamoeba* se encuentra fundamentalmente en la interfaz aire - agua donde se alimenta de diferentes bacterias (Preston y col., 2001). Aunque *Acanthamoeba* puede alimentarse de una gran variedad de géneros bacterianos algunos se describen como incomedibles para estos protozoos ya que no pueden digerirlos posiblemente debido a la presencia de toxinas, pigmentos tóxicos u otras estructuras propias de la pared bacteriana. Las cianobacterias son fácilmente digeridas por *Acanthamoeba* al igual que enterobacterias como *Escherichia coli* o *Klebsiella aerogenes* que, además, pueden usarse como nutrientes para el

cultivo *in vitro* de este protozoo (véase epígrafe 1.2.7.1) (Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Weekers y col., 1993). Aun así, la supervivencia de estas amebas en presencia de bacterias viene determinada por el tipo y densidad de bacterias, así, bajas densidades de bacterias gram negativas parecen favorecer su supervivencia mientras que altas densidades (10 a 1) de bacterias inhiben su crecimiento como es el caso de *Pseudomonas* (Wang y Ahearn, 1997). El mecanismo de inhibición puede deberse a la excreción de exotoxinas por parte de las bacterias o a un cambio de pH del medio (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

La interacción de *Acanthamoeba* con diferentes bacterias fue descrita por primera vez por Drozanski en 1956 y desde entonces se han realizado numerosos estudios relacionados. Uno de los primeros ejemplos es el descrito por Proca-Ciobanu y col. (1975) quienes, gracias a la microscopía electrónica, describieron bacterias endosimbiontes en el interior de un aislado ambiental de *Acanthamoeba*. Por otro lado, Hall y Voelz (1985) al estudiar el crecimiento de bacterias endosimbiontes en *Acanthamoeba* descartaron la presencia de fagosomas o fagolisosomas en esta interacción al no encontrar evidencia de membrana que envolviese las inclusiones bacterianas fagocitadas.

Las interacciones posibles entre *Acanthamoeba* y diferentes bacterias son incontables, se han descrito como endosimbiontes bacterias relacionadas con *Archea* (Hoffmann y col., 1998), con *Chlamydia* e incluso *Rickettsias* (Amann y col., 1997, Birtles y col., 1997, Fritsche y col., 1999, Horn y col., 1999), tanto en muestras ambientales como clínicas. Todo ello pone de manifiesto la importancia de *Acanthamoeba* como vector de enfermedades bacterianas (Marciano-Cabral, 2009).

Se han detectado también como endosimbiontes bacterias no cultivables como aquellas de la subclase  $\alpha$  de las *Proteobacterias* (Horn y col., 1999) o *Legionella* no cultivable (Steinert y col., 1997). Algunos ejemplos de las interacciones *Acanthamoeba* – bacterias, se recogen en la Tabla 7.

TABLA 7. Ejemplos de bacterias endosimbiontes de *Acanthamoeba*.

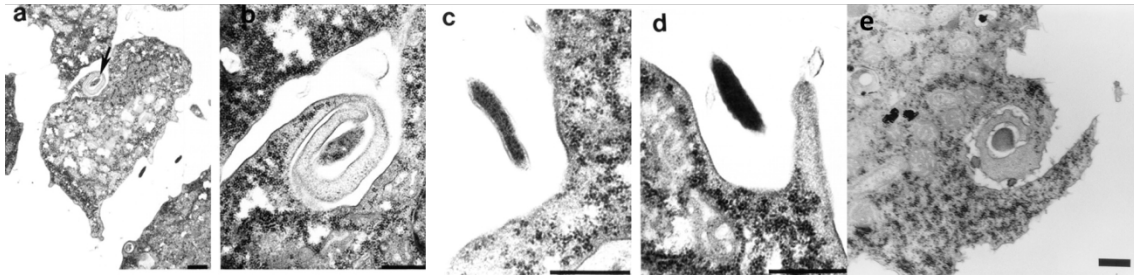
Bacteria	Referencia
<i>Aeromonas hydrophila</i>	(Yousuf y col., 2013a)
<i>Burkholderia cepacia</i>	(Michel y Hauroder, 1997)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	(Michel y Hauroder, 1997)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(Olofsson y col., 2013)
<i>Candidatus Nucleicultrix amoebiphila</i> (intranuclear)	(Schulz y col., 2014)
<i>Candidatus Odysella thessalonicensis</i>	(Birtles y col., 2000)
<i>Candidatus Parachlamydia</i> <i>Acanthamoebae</i> (Chlamydiaceae)	(Amann y col., 1997)
"Chlamydia-like"	(Birtles y col., 1997)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	(Essig y col., 1997)
<i>Comamonas acidovorans</i>	(Walochnik y col., 1998)
<i>Coxiella burnetii</i>	(La Scola y Raoult, 2001)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Yousuf y col., 2013a)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	(Barker y col., 1999)
<i>Helicobacter pylori</i>	(Marciano-Cabral y Cabral, 2003)
<i>Listeria</i> spp.	(Ly y Muller, 1990)
<i>Mycobacterium avium</i>	(Ovrutsky y col., 2013)
<i>Mycobacterium leprae</i>	(Lahiri y Krahenbuhl, 2008)
<i>Mycobacterium pseudoshottsii</i>	(Gupta y col., 2013)
<i>Mycobacterium shottsii</i>	(Gupta y col., 2013)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Michel y col., 1995)
<i>Rickettsia</i> spp.	(Fritsche y col., 1999)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	(Douesnard-Malo y Daigle, 2011)
<i>Shigella</i> spp.	(Jeong y col., 2007)
<i>Simkania negevensis</i>	(Kahane y col., 2001, Mehlitz y col., 2014)
<i>Vibrio cholerae</i>	(Shanan y col., 2011, Thom y col., 1992)

### 1.5.1.1. Interacción *Acanthamoeba* – *Legionella*

*Legionella* es una bacteria gram negativa que produce legionelosis o neumonía tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Está descrita además como uno de los agentes causales de las neumonías atípicas. Su transmisión no es directa de persona a persona sino a través de aerosoles producidos por diferentes sistemas como fuentes, torres de refrigeración o aspersores entre otros (ECDC, 2011). Debido a que comparte hábitat con *Acanthamoeba*, no es de extrañar que ya en 1980 Rowbotham describiese la interacción entre estos dos organismos.

*Legionella* es un patógeno intracelular que se divide en los macrófagos alveolares, sin embargo, para su supervivencia fuera del hombre, necesita de un hospedador natural fundamentalmente AVL y especialmente *Acanthamoeba*. Una vez que *Acanthamoeba* fagocita a *Legionella*, esta última escapa de la actividad de los lisosomas para multiplicarse en el citoplasma hasta que producen la lisis del protozoo liberando las bacterias al medio (Rowbotham, 1980). Este mecanismo de interacción se ve alterado por la temperatura, así a temperaturas de alrededor de los 37°C, *Legionella* es capaz de evadir la digestión amebiana y reproducirse mientras que a 20°C es *Acanthamoeba* quien utiliza las bacterias como nutriente (Anand y col., 1983).

La entrada de *Legionella* tanto en *Acanthamoeba* como en los macrófagos alveolares se produce por un mecanismo de "fagocitosis por enrollamiento" (*Coiling phagocytosis*) por la que se produce un pseudópodo que va enrollando a la bacteria en una espiral que da lugar a un fagosoma que inhibe la fusión del mismo con los lisosomas (Figura 17) (Bozue y Johnson, 1996).

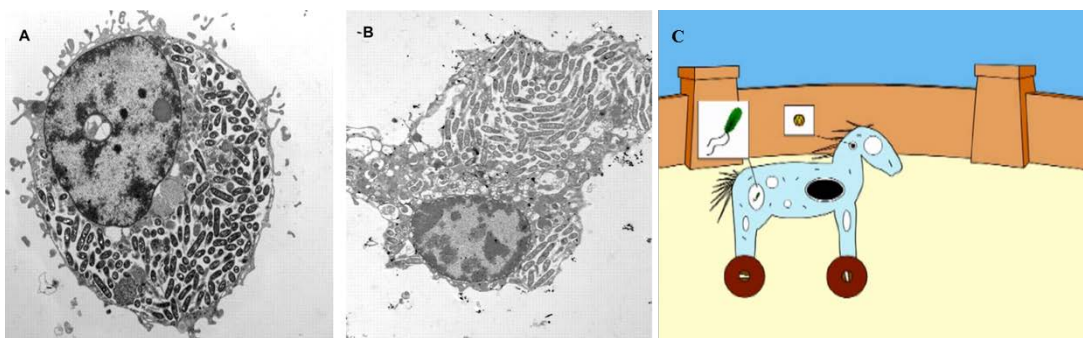


**FIGURA 17.** Fotografías de microscopía de transmisión electrónica de la fagocitosis por enrollamiento de *Legionella pneumophila* por *Hartmannella vermiformis* y *Acanthamoeba castellanii*. (a) La flecha señala la fagocitosis por enrollamiento (*Coiling phagocytosis*), las estructuras similares a los pseudopodos rodeando a *L. pneumophila* están aumentadas en (b). (c) y (d) muestras diferentes estadios de la invaginación de la membrana plasmática de *H. vermiformis* para internalizar a *L. pneumophila*. (e) Fagocitosis por enrollamiento de la cepa virulenta *L. pneumophila* Phil 2 por *A. castellanii* tras 30 min de co-cultivo. Barras: (a) 1  $\mu\text{m}$ ; (b-e) 0.5  $\mu\text{m}$ . Imágenes (a-d) tomadas de Venkataraman y col. (1998); imagen (e) tomada de Bozue y Johnson (1996)

Cuando la internalización ocurre en los macrófagos, tras la multiplicación, *Legionella* induce la apoptosis de los mismos pero no así en *Acanthamoeba* en la que induce necrosis. La salida de las bacterias de las amebas necróticas parece realizarse entonces por la formación de poros y no por la lisis celular (Gao y Kwai, 2000). Debido a que los mecanismos de reconocimiento, entrada y división intracelular de *Legionella* en células de mamífero como en amebas son muy similares (Figura 18), la interacción previa con *Acanthamoeba* parece conferir a *Legionella* una serie de atributos que le facilitan su supervivencia en el hospedador humano (Barker y Brown, 1994). Se han observado cambios en la morfología y fisiología de *Legionella* tras su paso por *Acanthamoeba* como por ejemplo reducción en el tamaño bacteriano cuando se compara con las bacterias que han crecido en cultivos *in vitro*, cambios en la superficie bacteriana o incluso en la motilidad (Barker y col., 1993). Además las bacterias que han crecido dentro de las amebas son más resistentes a los agentes biocidas (Barker y col., 1992, Barker y col., 1995) y presentan una mayor capacidad para dividirse e invadir los macrófagos humanos (Cirillo y col., 1999, Neumeister y col., 2000). Esta capacidad de aumentar la patogenicidad de *Legionella* u otras bacterias además de facilitar su entrada en

diferentes hospedadores ha hecho que *Acanthamoeba* se conozca como el “Caballo de Troya del mundo microbiano” (Barker y Brown, 1994) (Figura 18)

Además de la interacción de *Acanthamoeba* con diferentes especies de *Legionella* cultivables, se han descrito un grupo de bacterias conocidas como LLAP (*Legionella-like amoeba pathogens*, patógenos de amebas similares a *Legionella*) que pueden producir infecciones respiratorias en el hombre pero que no son cultivables *in vitro* (Drozanski, 1956). Se han descrito hasta 12 LLAP que se nombran como LLAP1-12 (Adeleke y col., 1996) algunas de las cuales se han descrito como el agente etiológico de neumonía comunitaria (Marrie y col., 2001). Debido a que estas bacterias no crecen *in vitro* en los medios de cultivo clásico, para su aislamiento se utiliza el co-cultivo con *Acanthamoeba* (La Scola y col., 2001).



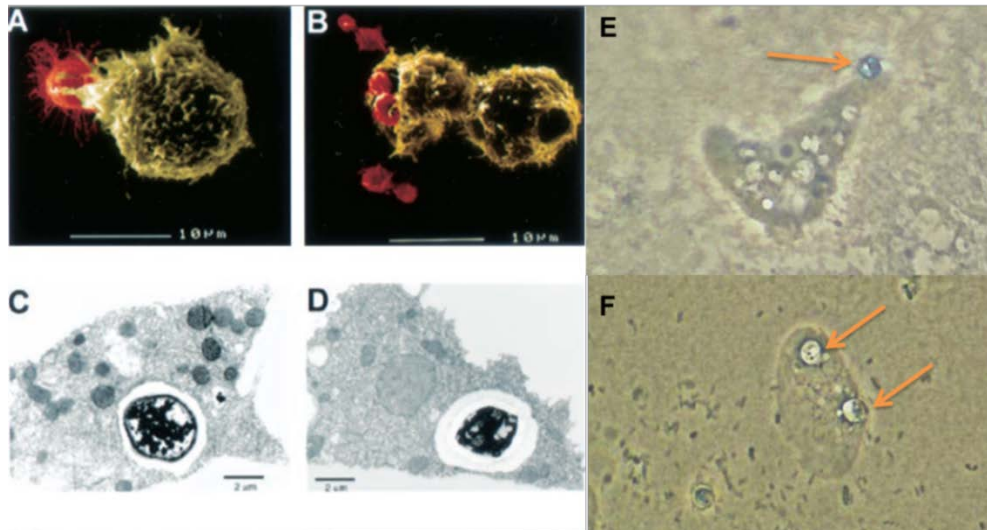
**FIGURA 18. *Acanthamoeba* como “Caballo de Troya”.** Fotografía de microscopía de transmisión electrónica de macrófagos (A) y de *A. polyphaga* (B) infectadas con *L. pneumophila*. (C) representación caricaturizada de *Acanthamoeba* como “Caballo de Troya” transportando en su interior bacterias flageladas y virus. Imágenes (A) y (B) tomadas de Molmeret y col. (2005); imagen (C) cedida por D. Francisco J. Carrillo.

### 1.5.2. Interacción *Acanthamoeba*-protozoos

Gómez-Couso y col (2007) describieron la capacidad de *Acanthamoeba* de fagocitar ooquistes de *Cryptosporidium* y de eliminarlos lentamente al medio a través de ensayos *in vitro*. Aun así no hay evidencias de que este fenómeno se produzca en la naturaleza (Figura 19).

### 1.5.3. Interacción *Acanthamoeba*-hongos

Streenbergen y col (2001) demostraron la supervivencia y reproducción de *Cryptococcus neoformans* en el interior de *Acanthamoeba*. Durante esta replicación se producía un acúmulo de vesículas con polisacáridos similares a las que se forman en los macrófagos humanos infectados por este hongo. Estas similitudes sugieren que la virulencia de *C. neoformans* en las células de mamíferos es una consecuencia de la adaptación de estos hongos a los depredadores ambientales como *Acanthamoeba* (Khan, 2009) (Figura 19).



**FIGURA 19.** Interacción de *Acanthamoeba* con hongos y protozoos. (A – D) *Acanthamoeba* en co-cultivo con *Cryptococcus neoformans*, (A – B) fotografías de microscopía electrónica de barrido, *Acanthamoeba* ha sido coloreada de amarillo y *C. neoformans* de rojo; (C-D) en microscopía electrónica de transmisión se observa la presencia de *C. neoformans* en el interior de *Acanthamoeba*. Imágenes tomadas de Steenbergen y col. (2001). (E-F) *Acanthamoeba* con ooquistes de *Cryptosporidium* en su interior. Imágenes tomadas de Gomez-Couso y col. (2007).

#### 1.5.4. Interacción *Acanthamoeba*-virus

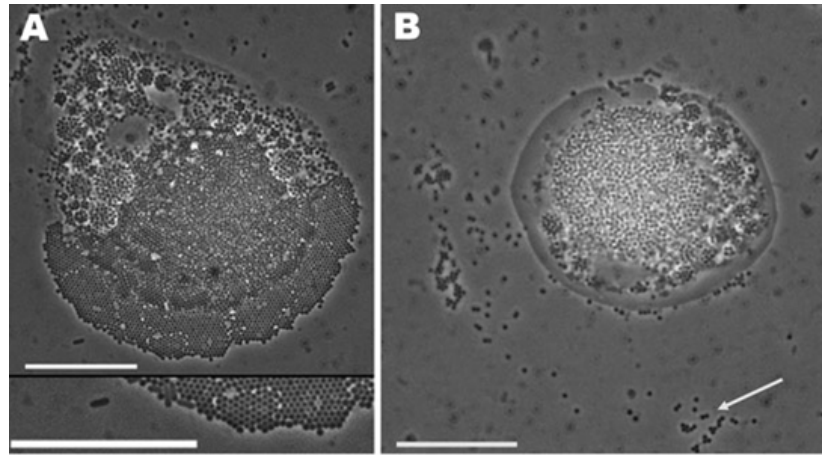
*Acanthamoeba* se ha descrito como reservorio de diferentes virus como adenovirus, enterovirus y mimivirus entre otros con posibles implicaciones en la salud humana.

Los Mimivirus son virus de hasta 400 nm de tamaño, similares a los micoplasmas. Es un virus de ADN de doble cadena con un genoma de 1.2 millones de pares de bases aproximadamente. Aunque estos virus no se han descrito como patógenos humanos sí que han demostrado capacidad de infección cuando se han inoculado en ratones (La Scola y col., 2003). Por ello se sospecha de estos virus como posibles co-agentes en las infecciones por *Acanthameoba* (Khan, 2009) (Figura 20).

El virus Coxsakie, productor de meningitis, miocarditis y otras infecciones en el hombre, es capaz de sobrevivir en el interior de *Acanthamoeba* tanto en su forma quística como de trofozoito. Cuando *Acanthameoba* entra en contacto con los macrófagos humanos, puede liberar a estos virus favoreciendo así su trasmisión (Mattana y col., 2006).

En un estudio realizado en las Islas Canarias (Lorenzo-Morales y col., 2007) se demostró que *Acanthamoeba* podía actuar como vector de diferentes serotipos de Adenovirus patógenos para el hombre, al encontrarse en un gran número de aislados ambientales de *Acanthamoeba* de los genotipos T4 y T3.

Al contrario que en los casos anteriores, la interacción entre *Acanthaomeba* y los echovirus parece que está reducida a un mero transporte en superficie (Danes y Cerva, 1981).



**FIGURA 20. *Acanthamoeba* infectada por mimivirus.** Imágenes de microscopía óptica de *Acanthamoeba* infectada con partículas similares a mimivirus. En la parte inferior de la imagen A puede observarse una región ampliada del citoplasma amebiano. En la imagen B la flecha señala partículas víricas libres. Barras = 10  $\mu\text{m}$ . Imagen tomada de (Gaze y col., 2011).

## 1.6. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La principal fuente de transmisión de organismos patógenos para el hombre es el agua, elemento imprescindible para todos los organismos vivos y, especialmente para la vida humana. Sin embargo, con el desarrollo demográfico e industrial el problema de la contaminación del agua se agrava debido, entre otros, a que los sistemas de conducción, almacenamiento e incluso tipos de tratamiento pueden favorecer la supervivencia de microorganismos que afectan a la salud humana. La calidad del agua destinada al uso y consumo humano está regulada con el fin de prevenir estos brotes infecciosos de origen hídrico que pueden estar causados por virus, bacterias y otros parásitos.

Las infecciones por AVL como *Acanthamoeba* o *B. mandrillaris*, se consideran enfermedades emergentes (Bravo y col., 2011, Lorenzo-Morales y col., 2013). Aunque si bien es cierto que las infecciones más graves a nivel de SNC se producen fundamentalmente en personas con el sistema inmune debilitado, los casos de QA no muestran relación con el estado inmunitario del paciente lo que abre enormemente el abanico de las personas expuestas a estas infecciones. A todo ello hay que sumarle el hecho de que *Acanthamoeba* puede actuar como vector y fuente de resistencia de otros patógenos como protozoos, bacterias y virus (Fritsche y col., 1999, Greub y Raoult, 2004).

En España, los datos relativos a la epidemiología de estas AVL en aguas destinadas al uso humano (consumo o recreo), son escasos y se centran fundamentalmente en las Islas Canarias y en el noreste peninsular. Son, aún más escasos los datos sobre la interacción de *Legionella* con *Acanthamoeba* en España. Esta falta de datos va íntimamente ligada a la ausencia de legislación relativa a la calidad sanitaria del agua en relación con las AVL.

Por todo ello y, con el objetivo de contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular de las AVL, especialmente de *Acanthamoeba*, en el presente trabajo se planteó la realización de un estudio sobre la presencia de estos protozoos en aguas potables, residuales, superficiales y baños naturales de la Comunidad Autónoma de Madrid así como de su interacción con *Legionella* y su caracterización en muestras clínicas.

---

## 2. OBJETIVOS.



## 2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular de las amebas de vida libre, especialmente *Acanthamoeba* en muestras ambientales de la Comunidad Autónoma de Madrid y de muestras clínicas de diferentes regiones del país.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- o Determinar la presencia de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* en aguas potables, residuales y superficiales de la Comunidad Autónoma de Madrid, durante el periodo 2008-2009 y 2011.
- o Caracterización molecular de *Acanthamoeba* en aguas potables, residuales y superficiales de la Comunidad Autónoma de Madrid durante el periodo 2008-2009 y 2011.
- o Determinar el papel vectorial de *Acanthamoeba* respecto a *Legionella* spp en aguas potables, residuales y superficiales de la Comunidad Autónoma de Madrid.
- o Determinar la utilidad del co-cultivo *Acanthamoeba-Legionella* para la recuperación de esta última a partir de muestras ambientales.
- o Estudiar *Acanthamoeba* como patógeno ocular y del Sistema Nervioso Central en diferentes muestras clínicas.



---

### 3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES.



### **3.1 ESTUDIO 1: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ACANTHAMOEBA* ISOLATED IN WATER TREATMENT PLANTS AND COMPARISON WITH CLINICAL ISOLATES.**

**Magnet A**<sup>1</sup>, Galván AL<sup>1,2</sup>, Fenoy S<sup>1</sup>, Izquierdo F<sup>1</sup>, Rueda C<sup>1</sup>, Fernandez Vadillo C<sup>1</sup>, Pérez-Irezábal J<sup>3</sup>, Bandyopadhyay K<sup>4</sup>, Visvesvara GS<sup>5</sup>; da Silva AJ<sup>4</sup>; del Aguila C<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Parasitology Laboratory. San Pablo CEU University, Urbanización Montepríncipe. Boadilla del Monte, Madrid Spain. <sup>2</sup>Grupo de Parasitología. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia <sup>3</sup> Hospital Cruces, Baracaldo, Vizcaya, Spain. <sup>4</sup>Center for Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria, and <sup>5</sup>National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

**Publicado en:** Parasitology Research 2012; 111(1):383-92.

**doi:** 10.1007/s00436-012-2849-2.

**Índice de impacto:** 2.852

**Categoría JCR:** "Parasitology"

**Posición dentro de su categoría:** 1er tercil



## Resumen

### **“Caracterización molecular de aislados de *Acanthamoeba* de plantas de tratamiento de agua y su comparación con aislados clínicos”.**

Las amebas de vida libre (AVL) como *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Naegleria* tienen una distribución cosmopolita habiéndose aislado tanto en agua dulce como salada, agua potable, sistemas de ventilación y suelos, entre otros. *Naegleria fowleri* produce una infección del Sistema Nervioso Central (SNC) conocida como Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) que suele ser mortal. Por otro lado, *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris* producen una infección crónica del SNC, la Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) que también suele ser mortal, además de patología pulmonar o cutánea.

En el presente trabajo se analizaron un total de 116 muestras (44 de origen clínico y 72 muestras ambientales) para el estudio de *Acanthamoeba*. Las muestras ambientales procedían de cuatro Plantas de Tratamiento de Agua Potable (ETAP, n=32), siete Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR, n=28) y seis zonas de influencia de dichas plantas (ZI, n=12) sitas todas ellas en cuatro cuencas fluviales. Las muestras se tomaron en el invierno y la primavera de 2008 en la zona centro de España. Se recogieron hasta 50 l de agua en las EDARs y ZI y hasta 100 l en las ETAPs que se concentraron según el sistema IDEXX Filta-Max®.

Por cultivo, *Acanthamoeba* se aisló en 65 de las 72 muestras ambientales (90,3%) y se detectó por PCR en 63 muestras (87,5%). El análisis de los resultados de PCR y cultivo conjuntamente, mostró que el 100% de las muestras analizadas fueron positivas para *Acanthamoeba*.

Por otro lado, de las 44 muestras clínicas analizadas, únicamente nueve fueron positivas para *Acanthamoeba* por ambas técnicas. De estas muestras se pudieron establecer 17 cepas de *Acanthamoeba* en medio axénico PYG (ocho de ellas aisladas de las ETAPs y nueve de las muestras clínicas). Tanto estos aislados como 24 muestras ambientales se genotiparon. Los genotipos observados fueron T4/1, T4/8 y T4/9. Se estudió a su vez el potencial patógeno

de las cepas ambientales, para ello se inocularon en ratones desnudos (*nude*) vía intranasal. Todos los animales presentaron síntomas de infección del SNC o murieron antes del día 9 post-inoculación. Para confirmar que la sintomatología/muerte de los ratones era debida a la infección por *Acanthamoeba* se examinaron por inmunofluorescencia cortes histológicos de pulmón y encéfalo. Así mismo, se realizó el aislamiento de este protozoo a partir de muestras procedentes de estos mismos órganos obteniéndose resultados positivos por ambas técnicas para todos los animales infectados.

Este estudio describe, por primera, vez la presencia de *Acanthamoeba* genotipo T4 en el 100% de las muestras analizadas, incluyendo agua potable y residual, en la zona centro de España. Teniendo en cuenta que este genotipo está descrito como potencialmente patógeno, los resultados sugieren un posible riesgo para la salud humana en especial para los usuarios de lentes de contacto.

# Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates

A. Magnet · A. L. Galván · S. Fenoy · F. Izquierdo ·  
C. Rueda · C. Fernandez Vadillo · J. Pérez-Irezábal ·  
K. Bandyopadhyay · G. S. Visvesvara · A. J. da Silva ·  
C. del Aguila

Received: 13 December 2011 / Accepted: 1 February 2012 / Published online: 7 March 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** A total of 116 samples (44 clinical specimens and 72 environmental samples) have been analyzed for the presence of *Acanthamoeba*. The environmental samples (ESs) were collected from four drinking water treatment plants (DWTP,  $n=32$ ), seven wastewater treatment plants ( $n=28$ ), and six locations of influence ( $n=12$ ) on four river basins from the central area of Spain (winter–spring 2008). Water

samples were concentrated by using the IDEXX Filta-Max<sup>®</sup> system. *Acanthamoeba* was identified in 65 of the 72 ESs by culture isolation (90.3%) and 63 by real-time PCR (87.5%), resulting in all sampling points (100%) positive for *Acanthamoeba* when considering both techniques and all the time period analyzed. Nine of the 44 clinical specimens were positive for *Acanthamoeba*. Seventeen *Acanthamoeba* strains (eight from four DWTP and nine from clinical samples) were also established in axenic-PYG medium. Twenty-four of the ESs and the 17 *Acanthamoeba* sp. strains were genotyped as T4/1, T4/8, and T4/9. The eight strains isolated from the DWTP samples were inoculated in nude mouse to ascertain their potential pathogenicity in this model. Animals that were inoculated died or showed central nervous system symptoms 9 days post-inoculation. Examination of immunofluorescence-stained brain and lung tissue sections showed multiple organisms invading both tissues, and re-isolation of trophozoites was successful in these tissues of all infected animals. For the first time, potentially pathogenic *Acanthamoeba* T4 has been detected in 100% of different types of water samples including tap water and sewage effluents in the central area of Spain suggesting a potential health threat for humans especially for the contact lens wearers.

A. Magnet · A. L. Galván · S. Fenoy · F. Izquierdo · C. Rueda ·  
C. Fernandez Vadillo · C. del Aguila  
Parasitology Laboratory, San Pablo CEU University,  
Urbanización Montepríncipe,  
Boadilla del Monte, Madrid, Spain

A. L. Galván  
Grupo de Parasitología. Escuela de Microbiología,  
Universidad de Antioquia,  
Medellín, Colombia

J. Pérez-Irezábal  
Hospital Cruces,  
Baracaldo, Vizcaya, Spain

K. Bandyopadhyay · A. J. da Silva  
Center for Global Health,  
Division of Parasitic Diseases and Malaria,  
Centers for Disease Control and Prevention,  
Atlanta, GA, USA

G. S. Visvesvara  
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases,  
Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases,  
Centers for Disease Control and Prevention,  
Atlanta, GA, USA

C. del Aguila (✉)  
Facultad de Farmacia, Urbanización Montepríncipe,  
28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain  
e-mail: cagupue@ceu.es

## Introduction

Free-living amoebae (FLA), belonging to the genera *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, and *Naegleria* occur worldwide. *Naegleria fowleri* causes an acute infection of the central nervous system (CNS) called primary amebic meningoencephalitis leading to death in most cases, whereas several strains of *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* can

cause a chronic infection of the CNS, granulomatous amebic encephalitis (GAE), as well as a disseminated infection affecting the skin and lungs, also leading to death. Of these three agents, *Acanthamoeba* is isolated as the etiologic agent of *Acanthamoeba* keratitis (AK) (Visvesvara et al. 2007), but it is indeed more frequently detected in nasal mucosa of healthy people (De Jonckheere and Michel 1988).

As the number of patients suffering from AK rises worldwide, so has the interest in this infection. *Acanthamoeba* has been isolated worldwide from disparate environments such as fresh and salt water, drinking water, contact lens (CtL) washing solutions, ventilation systems, dialysis apparatus, hydrotherapy areas in hospitals, and dental irrigation systems (Booton et al. 2005; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Visvesvara et al. 2007). In addition, outbreaks of CtL-associated AK have recently been reported in the USA (Joslin et al. 2007; Visvesvara et al. 2007; Verani et al. 2009).

However, to our knowledge, there are only five reports describing 17 cases of CtL-associated AK in Spain (Cruz et al. 2004; de Miguel et al. 1999; Lopez et al. 2000; Lorenzo-Morales et al. 2007; Perez-Pomata et al. 2006). In addition, there are only three publications that describe cases of GAE (Gene et al. 2007; Peman et al. 2008; Seijo Martinez et al. 2000). Environmental studies on *Acanthamoeba* epidemiology are also rare in Spain, and most of them were carried out on the Tenerife Island, which showed high concentrations of the amoeba in fresh (59%) and salt water (40%) (Lorenzo-Morales et al. 2005a; Lorenzo-Morales et al. 2005b). The aim of this study was to ascertain the presence of *Acanthamoeba* in water samples collected from the central area of Spain and to characterize and compare these isolates with those obtained from clinical samples.

## Materials and methods

### Samples

Seventeen sample sites on four river basins from the central area of Spain, where livestock, mainly cattle are being raised for milk and meat, were selected (Fig. 1 and Table 1). These sites included four drinking water treatment plants (DWTP), one on each river basin, seven wastewater treatment plants (WWTP), and six locations of influence (LI) (one on the edge of a river, two reservoirs, and three gauging stations). The LIs were selected because of high livestock activity in the area or due to its location downstream from the WWTP. The sampling was done in duplicate during the winter and spring of 2008. For the DWTP, 100 l of water was collected from each site (raw water—at the point of entry and finished water—at the end of the process). We collected 50 l from the WWTP, each at both points, as above and 50 l for the six LIs. The sampling scheme therefore included the initial collection of 16

water samples from DWTP in the winter and 56 water samples in the spring from the entire area under study (DWTP, WWTP, and LI). In all cases, the water samples were concentrated by using the IDEXX® Filta-Max system as per the manufacturer's instructions and following the Environmental Protection Agency of the United States (US EPA) 1623 Method (US EPA 2005). A total of 5 ml was finally eluted from each concentrated sample and fractionated for different analysis. Samples for molecular analysis were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Additionally, 44 clinical samples were obtained from patients referred to hospitals and clinical laboratories for AK diagnosis, during 2005–2008 that included corneal scrapes, vitreous humor, contact lenses, and contact lens solutions (Table 1).

### *Acanthamoeba* culture

Approximately 80  $\mu\text{l}$  of the 72 concentrated water samples and the 44 clinical samples (corneal scrapes, vitreous humor, contact lenses, and contact lenses solutions) were inoculated onto 2% Neff's saline non-nutrient agar plates seeded with heat-killed *Escherichia coli* and incubated at  $28^{\circ}\text{C}$ . Initial cultures were monitored daily and subcultured by transferring small pieces of agar containing *Acanthamoeba* to a fresh plate (Fig. 2a), and the amoebae were cloned by dilution.

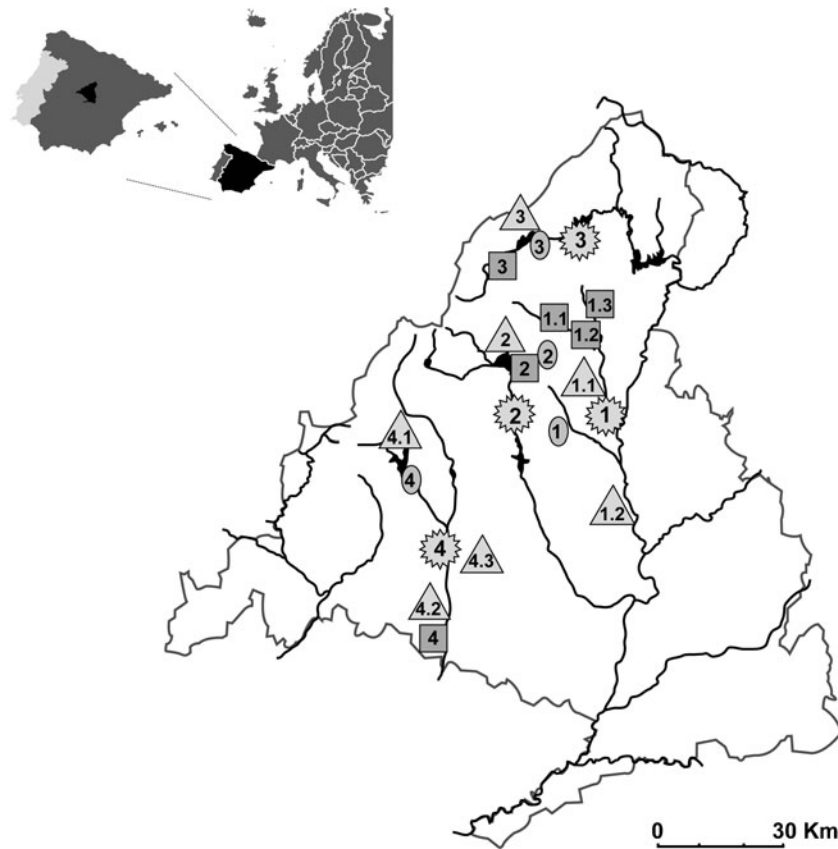
*Acanthamoeba* isolated in agar plates from nine clinical specimens and from eight samples obtained from four DWTPs (during winter and spring samplings) were then transferred into axenic cultures by placing the amoebae into PYG medium (0.75% proteose peptone, 0.75% yeast extract, and 1.5% glucose with 40  $\mu\text{g}$  gentamicin per milliliter) at  $28^{\circ}\text{C}$  without shaking (Fig. 2b). Seventeen strains were established and characterized and eleven of them were inoculated in mice to assess their pathogenic profile (Table 2).

### Molecular methods

**DNA extraction** DNA was extracted from 200  $\mu\text{l}$  of the concentrated water samples and from the axenically established strains by using the *DNAeasy*® *Blood & Tissue* (QUIAGEN, Valencia, Calif.) and following manufacturer's instructions.

**Real-time PCR assay** A real-time PCR was used for the detection of *Acanthamoeba* (Qvarnstrom et al. 2006). Real-time PCR reactions were performed following the cycling structure and conditions described elsewhere (Qvarnstrom et al. 2006).

**Sequencing** Forward and reverse primers *JDP1* (5'-GGCCAGATCGTTTACCGTGAA) and *JDP2* (5'-TCTACAAGCTGCTAGGGGAGTCA) which amplify a fragment of approximately 500 bp of the ASA. S1 gene was used to produce amplicons of the isolates for genotyping



**Fig. 1** Geographical location of the studied sampling points. Four Drinking Water Treatment Plant (DWTPs) ○: Colmenar (1), Santillana (2), Pinilla (3), and Valmayor (4); seven Waste Water Treatment Plant (WWTPs) △: Guadalix (1.1), Arroyo de la Vega (1.2), Santillana (2), Pinilla (3), Los Escoriales (4.1), Navalcarnero (4.2), and Arroyo del Soto

(4.3); and six Locations of Influence (LIs) □: Guadalix gauging station (1.1), Pedrezuela reservoir (1.2), Gargera gauging station (1.3), Santillana reservoir (2), and Lozoya gauging station (3), Guadarrama edge of river (4); located on four river basins ☆: Guadalix/Jarama (1), Manzanares (2), Lozoya (3), and Guadarrama (4) were studied

purposes as described previously (Schroeder et al. 2001). The PCR product was purified with the *Strata Prep PCR purification kit*<sup>®</sup> (Stratagen, La Jolla, CA, USA) and sequenced on both ends through cycle sequencing reactions using the Big dye V3.1 chemistry (ABI, Foster City, CA, USA). The sequencing reactions were purified

in the Centri-sep columns<sup>®</sup> (Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA) and loaded onto the ABI 3130x1 Genetic Analyzer<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Assembling, editing, and aligning of the sequences were done with GeneStudio suite (GeneStudio Inc., Swannee, GA) and with DNASTAR Lasergene 7 SeqMan (DNASTAR Inc., Madison, WI). To determine the genotypes, sequencing data was aligned with *Acanthamoeba* genotype sequences available in GenBank using the SeqMan program.

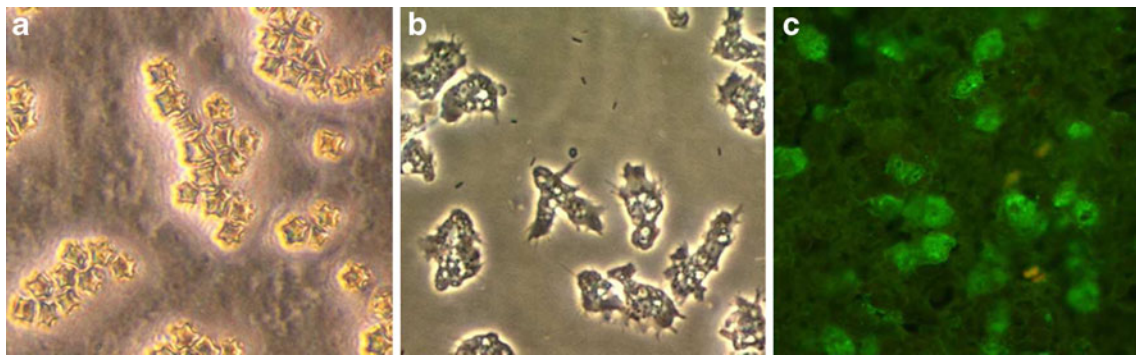
**Table 1** Origin of the samples studied

Sample type	Source	<i>n</i>
Clinical	Corneal scrapes	26
Clinical	Contact lens solution (Madrid)	5
Clinical	Contact lens (Madrid)	9
Clinical	Vitreous humor (Madrid)	4
Environmental	DWTP ws	16
Environmental	DWTP ss	16
Environmental	WWTP ss	28
Environmental	LI ss	12
		Total, 116

DWTP drinking water treatment plant, WWTP wastewater treatment plant, LI location of Influence, ws winter sampling, ss spring sampling

#### Pathogenicity testing

Thirty six 6-week-old nude mice were divided into 12 groups of three animals and as previously described (Gianinazzi et al. 2005) were intranasally inoculated with  $1 \times 10^6$  trophozoites/mouse in 6  $\mu$ l of Page amoeba saline per strain, including a mock-infected group (negative control) that was inoculated with Page amoeba saline alone. The eight environmental strains were inoculated to evaluate their potential pathogenic properties in this model and three strains (USP-CR2-A32, USP-CR5-A35, and USP-CR6-A36)



**Fig. 2** **a** *Acanthamoeba* isolate from a water sample in agar plate showing the characteristic polyhedral cysts. **b** Trophozoites growing in PYG medium. **c** Brain tissue section of a nude infected mouse with

the environmental strain USP-AWP-14 showing *Acanthamoeba* trophozoites by IFA, ×40 magnification

from AK patients were used as positive controls (Table 2). The mice were checked daily for clinical signs of CNS infection such as ruffling of fur, aimless wandering, and coma. Upon onset of clinical signs, the animals were sacrificed and tissue samples from brain and lungs were collected and used for (a) isolation of viable amoebae and (b) immunofluorescence studies.

Tissue samples from the brain and lung of all infected nude mice were gently disrupted and inoculated on agar plates as described above. The plates were sealed, kept at 34°C, and examined daily for the presence of amoebae.

**Immunofluorescence identification of *Acanthamoeba*** Immunofluorescence (IFA) was performed on deparaffinized brain and lung tissue sections as previously described (Seijo Martinez et al. 2000) except a 1:1,000 dilution of rabbit

anti-*Acanthamoeba castellanii* polyclonal hyperimmune sera made in our laboratory was used.

## Results

### *Acanthamoeba* in water samples

The 16 water samples initially obtained from DWTP in winter were all positive for *Acanthamoeba* by real-time PCR (100%) and 15 of them (93.8%) by agar culture. This fact encouraged us to repeat the same sampling points (DWTP) in spring as well as to increase the sampling area including different kinds of water (WWTP and LI). In spring, we determined by real-time PCR the presence of *Acanthamoeba* spp. directly in 47 of the 56 spring samples

**Table 2** Origin and genotypes of the investigated *Acanthamoeba* strains

Strain	Sequence type	Origin	Source of reference
USP-C3-A6	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-C3-A7	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-M-A8	T4/1	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-CR1-A31	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-CR2-A32 <sup>a</sup>	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-CR3-A33	T4/8	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-CR4-A34	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-CR5-A35 <sup>a</sup>	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-CR6-A36 <sup>a</sup>	T4/9	Keratitis patient's cornea	New isolate
USP-AWP-A9 <sup>a</sup>	T4/8	Finished water DWTP1 w1s	New isolate
USP-AWP-A10 <sup>a</sup>	T4/8	Finished water DWTP2 w2s	New isolate
USP-AWP-A11 <sup>a</sup>	T4/8	Finished water DWTP1 w2s	New isolate
USP-AWP-A12 <sup>a</sup>	T4/8	Finished water DWTP2 w1s	New isolate
USP-AWP-A13 <sup>a</sup>	T4/8	Finished water DWTP1 s1s	New isolate
USP-AWP-A14 <sup>a</sup>	T4/8	Raw water DWTP1 w1s	New isolate
USP-AWP-A15 <sup>a</sup>	T4/8	Raw water DWTP4 w1s	New isolate
USP-AWP-A16 <sup>a</sup>	T4/8	Finished water DWTP3 w1s	New isolate

<sup>a</sup>Strain used for the pathogenicity test  
 DWTP1 drinking water treatment plant on river basin 1,  
 DWTP2 drinking water treatment plant on river basin 2,  
 DWTP3 drinking water treatment plant on river basin 3,  
 DWTP4 drinking water treatment plant on river basin 4,  
 w1s first winter sampling, w2s second winter sampling, s1s first spring sampling, s2s second spring sampling

studied (83.9%), and in agar culture, we isolated *Acanthamoeba* spp. in 50 samples (89.3%) (Table 3). Considering

**Table 3** Presence of *Acanthamoeba* sp. in water samples from the spring sampling

	Origin	<i>Acanthamoeba</i> sp.	
		Agar culture (1 s/2 s)	Real-time PCR (1 s/2 s)
Winter	DWTP-1. R	+/+	+/+
	DWTP-1.F	+/+	+/+
	DWTP-2.R	+/+	+/+
	DWTP-2.F	+/+	+/+
	DWTP-3.R	+/+	+/+
	DWTP-3.F	+/+	+/+
	DWTP-4.R	+/+	+/+
	DWTP-4.F	-/+	+/+
	Total	93.8%	100%
Spring	DWTP-1. R	+/-	+/-
	DWTP-1.F	+/+	+/+
	WWTP-1.1.R	+/-	+/+
	WWTP-1.1.F	-/-	+/+
	LI-1.1	+/+	+/+
	WWTP-1.2.R	+/+	+/+
	WWTP 1.2 F	+/+	+/+
	LI-1.2	+/-	+/+
	LI-1.3	+/+	+/-
	DWTP-2.R	+/+	+/+
	DWTP-2.F	+/+	+/+
	WWTP-2.R	+/+	+/+
	WWTP-2.F	+/+	+/+
	LI-2	+/+	+/+
	DWTP-3.R	+/+	+/-
	DWTP-3.F	+/+	+/+
	WWTP-3.R	+/+	+/-
	WWTP-3.F	+/+	+/-
	LI-3	+/+	+/-
	DWTP-4.R	+/+	+/+
	DWTP-4.F	+/+	+/+
	WWTP-4.1.R	+/+	+/-
	WWTP-4.1.F	+/+	+/-
	WWTP-4.2.R	+/+	+/+
	WWTP-4.2.F	+/+	+/+
	WWTP-4.3.R	+/-	+/+
	WWTP-4.3.F	+/+	+/+
	LI-4	+/+	+/-
Total	89.3%	83.9%	

The points of sampling are grouped by fluvial basins

DWTP drinking water treatment plant, WWTP wastewater treatment plant, LI location of influence, R raw water, F finished water, 1 s/2 s first sampling/second sampling

all the samples (72) and the sampling points (28) analyzed in winter and spring, 57 of the samples were positive by both techniques while six and eight were positive either by real-time PCR or by culture, respectively (Tables 3 and 4). The only negative sample by both techniques was the raw water from DWTP-1 obtained in the second spring sampling meaning that *Acanthamoeba* sp. was detected at the entrance of 93.8% of DWTP but in the 100% of finished water (Tables 3 and 5). However, the water sample obtained from the same point in winter was positive. Finally, 27 of 28 sampling points (96.4%) were positive for *Acanthamoeba* spp. in spring, but all of them were positive considering all the time period analyzed.

#### Molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. isolates and strains

From the 63 positive samples by real-time PCR, only 24 could be amplified with the JDP primers. All of them were characterized as the T4 genotype group based on the sequencing analysis of this fragment. By applying the nomenclature of Booton et al. (2002), a total of 22 samples (91.7%) are grouped within the T4/8 genotype and two of them (8.3%) within T4/1 (Table 6).

Additionally, a collection of 8 *Acanthamoeba* spp. strains obtained from water samples (winter and spring) from raw and finished water of four DWTPs were established in axenic liquid medium. In all cases, a T4/8 genotype was observed (Tables 2 and 6). Of the nine clinical strains, seven (78%) were genotype T4/9, one (11%) was T4/8, and one (11%) was T4/1 (Tables 2 and 6).

#### Pathogenic potential in nude mouse model of environmental *Acanthamoeba* T4 strains

Experimental infection of nude mice with the eight environmental *Acanthamoeba* T4 strains resulted in the development of clinical signs characteristic of free-living amoeba CNS

**Table 4** Comparison between results obtained by real-time PCR and by agar culture with raw and finished water of the winter and spring samples

Sampling point	Real-time PCR		Culture	
	No.+S/TS	%	No.+S/TS	%
DWTP	30/32	93.8	30/32	93.8
WWTP	24/28	85.7	24/28	85.7
LI	9/12	75.0	11/12	91.7
Total	63/72	87.5	65/72	90.3

No.+S number of positive samples, TS total samples, % percentage, DWTP drinking water treatment plant, WWTP wastewater treatment plant, LI location of influence

**Table 5** Comparison between results obtained by real-time PCR and by culture with raw or finished water of the winter and spring samples

Sampling point	DWTP				WWTP			
	Culture		Real-time PCR		Culture		Real-time PCR	
	No.+S/TS	%	No.+S/TS	%	No.+S/TS	%	No.+S/TS	%
Raw water	15/16	93.8	14/16	87.5	12/14	85.7	12/14	85.7
Finish water	15/16	93.8	16/16	100	12/14	85.7	12/14	85.7
Total	30/32	93.8	30/32	93.8	24/28	85.7	24/28	85.7

No. + S number of positive samples, TS total samples, % percentage, DWTP drinking water treatment plant, WWTP wastewater treatment plant, LI location of influence

infection such as reduced level of alertness or consciousness and ataxia. The animals were sacrificed 24–48 h after the onset of the signs. After day 9 post-infection (p.i.), all animals either died or were sacrificed because they presented symptoms of CNS infection. The nine mice considered as positive controls and inoculated with the human strains USP-CR2-32, USP-CR5-35, and USP-CR6-36 were sacrificed at day 5 p.i.;

**Table 6** Genotypes from environmental and human strains and isolates characterized

	Origin	Genotype
Winter samples	DWTP-1. R 1s	T4/8
	DWTP-1. F 1s	T4/8
	DWTP-1. F 2s	T4/8
	DWTP-2. F 1s	T4/8
	DWTP-2. F 2s	T4/8
	DWTP-3. F 1s	T4/8
	DWTP-4. R 1s	T4/8
Spring samples	DWTP-1. F 1s	T4/8
	DWTP-1. F 2s	T4/8
	WWTP-1.2. R 2s	T4/8
	WWTP-1.2. F 2s	T4/1
	LI-1.2. 2s	T4/8
	DWTP-2. R 2s	T4/8
	LI-2. 2s	T4/8
	DWTP-3. F 2s	T4/8
	WWTP-3. F 1s	T4/8
	LI-3. 2s	T4/8
	DWTP-4. F 1s	T4/8
	DWTP-4. F 2s	T4/8
	WWTP-4.1. F 1s	T4/8
WWTP-4.1. F 2s	T4/8	
WWTP-4.2. R 2s	T4/8	
WWTP-4.2. F 2s	T4/8	
WWTP-4.3. F 2s	T4/1	

DWTP: Drinking water treatment plant; WWTP: Wastewater treatment plant; LI: Location of influence, R: Raw water; F: Finished water. AK: *Acanthamoeba* keratitis. 1 s: 1<sup>st</sup> sampling, 2 s: 2<sup>nd</sup> sampling.

and the three mice inoculated with Page amoeba solution and considered as negative controls were sacrificed at day 28. The examination of IFA-stained brain and lung tissue sections from all, excepting the negative control mice, showed multiple organisms invading both tissues, displaying areas marked by a dense presence of trophozoites (Fig. 2c). Re-isolation of trophozoites was successful for the brain and lungs of all infected animals with the environmental or the human *Acanthamoeba* isolates. In the three mice used as the negative control, no clinical signs of infection became apparent and amoebae were not isolated from tissues samples at any time.

## Discussion

*Acanthamoeba* spp. has come under increased attention recently because of many recognized outbreaks of *Acanthamoeba* keratitis (Acharya et al. 2007; Verani et al. 2009). Since they are commonly found in various environmental water sources throughout the world (Schuster and Visvesvara 2004), an increasing interest in a better quality control of water sources for human use has pointed out the necessity to carry out epidemiological studies based on molecular tools to better define the risk factors and sources of infection of these *Amoebae*.

A wide variety of sampling ranging from 5 to 100 l of water and concentration methods including filtration and other devices for *Acanthamoeba* retention and elution have been proposed (Lorenzo-Morales et al. 2005b; Bonilla-Lemus et al. 2009; Gianinazzi et al. 2009; Valster et al. 2009; Boost et al. 2008; Thomas et al. 2008) making the results obtained difficult to compare. We therefore decided to use the IDEXX<sup>®</sup> Filta-Max system to concentrate *Acanthamoeba* since this system has already been validated for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* by the US EPA. Using this system would not only allow the use of the same sample of water for the detection and enumeration of *Acanthamoeba* as well as *Giardia* and *Cryptosporidium* but also would save time and cost.

From the 72 water samples studied, we observed 87.5% and 90.3% of *Acanthamoeba*-positive samples by real-time PCR or agar culture, respectively. If we analyze the different types of water studied, *Acanthamoeba* spp. was detected by real-time PCR and culture in 93.8% of DWTP samples, in 85.7% of WWTP samples, and in 75% and 91.7% of LI samples. This high presence of *Acanthamoeba* in water samples from the central area of Spain correlates with the limited data available in the literature and with the fact that a high seroprevalence (>80%) of anti-*Acanthamoeba* antibodies has been observed in healthy population (Chappell et al. 2001; Brindley et al. 2009) suggesting a potential high environmental contamination. Although a number of studies carried out in many different regions (except the central area) of Spain have identified *Acanthamoeba* spp. in rivers (Marti Mallen et al. 1986), bottled mineral water (Varela Mato et al. 1987), public fountains (Paniagua Crespo et al. 1990), thermal spas (Penas Ares et al. 1994), aqua cultures of turbot mussels (Loves et al. 1996), tap water and sea water (Lorenzo-Morales et al. 2005b), and beach sand (Lorenzo-Morales et al. 2005a), there is only one report of *Acanthamoeba* spp. identification from Central Spain in drinking water fountains (Madrigal Sesma et al. 1982). However, the present study is the only one that identifies the presence of *Acanthamoeba* in raw and finished water from DWTP and WWTP originating from the Central Spain.

Similarly, *Acanthamoeba* spp. has been identified in many countries around the world for example in Bulgaria (Tsvetkova et al. 2004), Osaka (Japan) (Edagawa et al. 2009), USA (John and Howard 1995; Ettinger et al. 2003; Shoff et al. 2008; Stockman et al. 2011; Mahmoudi et al. 2012), Taiwan (Hsu et al. 2009), Brazil (Caumo et al. 2009; Magliano et al. 2009), South Korea (Jeong and Yu 2005), and Switzerland (Gianinazzi et al. 2009).

In this study, raw and finished water from DWTP and WWTP has been analyzed by real-time PCR and agar cultivation in order to assess the efficacy of disinfection methods used. Although real-time PCR is a more sensitive method, it can be inhibited by many substances in the sample, and this is a particularly major problem when testing environmental samples. Therefore, we decided to use both methods. The culture method seemed to be slightly more sensitive than the real-time PCR (90.3% versus 87.5%). However, it is important to bear in mind that the number of samples analyzed was not enough to show significant differences. The only difference between the two methods was seen in the sample LI (91.7% versus 75.0%) suggesting that the characteristics of the water sample may have influence on the sensitivity of the method used (Table 4). The data show that the 28 sampling points (100%) should be considered as positive for *Acanthamoeba* spp., indicating that the central area of Spain bears the burden of one of the highest rates of the presence of *Acanthamoeba* in water samples reported to date. Moreover, *Acanthamoeba* spp. was detected

in the raw and finished water of all DWTPs and WWTPs, indicating that the purification processes used in these treatment plants did not eliminate this opportunistic agent. This fact is important to highlight since such amoebae have been described as vectors or reservoirs of pathogenic microorganisms (Scheid et al. 2008; Valster et al. 2011; Huang et al. 2011). Our results are not surprising, since similar data have been obtained by the previous reports from DWTP. In France, Thomas et al. (2008) in a study carried out in a DWTP with Seine River water showed that FLA are resistant to the treatment chain of sand filtration, ozonation, carbon filtration, and chlorination. Similarly in Germany, Hoffman and Michel (2001) demonstrated that FLA could survive the water purification processes used. Finally, Edagawa et al. recognized that in Osaka (Japan), the same sequence of purification process was not able to decontaminate drinking water from FLA (Edagawa et al. 2009). However, to our knowledge, this is the first study in the characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* from WWTP sewage effluents.

Based on the molecular characterization, all environmental *Acanthamoeba* isolates used in this study have been identified as T4 genotype. The clinical samples were also identified as T4 genotype, but most of them (78%) were T4/9 and the others T4/8 (11%) and T4/1 (11%). According to many studies carried out so far (Booton et al. 2005; Booton et al. 2002; Ledee et al. 2009), genotype T4 is not only the most frequent genotype causing AK in humans, but it is also the most frequently isolated from environmental samples. With the worldwide prevalence of genotype T4, regardless of region, it is not surprising that about 90% of *Acanthamoeba* isolates associated with AK are genotype T4 (Ledee et al. 2009).

In most of the previous studies on *Acanthamoeba* epidemiology carried out in Spain, specific characterization was made based on morphological features. In Galicia (NW, Spain), in most cases, *Acanthamoeba polyphaga* was reported; *A. polyphaga* belongs to T4 genotype. Additionally, *Acanthamoeba griffini* and *Acanthamoeba astronyxis* were also reported, so T3 and T7 would also be present in this region of Spain (Arias Fernandez et al. 1989; Lloves et al. 1996; Paniagua Crespo et al. 1990). Although, molecular techniques were applied to the studies carried out on isolates from tap and sea water in the Canary Islands, the authors identified the isolates as *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, or *Acanthamoeba* spp. (Lorenzo-Morales et al. 2005b; Lorenzo-Morales et al. 2005a). With this information, we may only assume that T4 and T7 genotypes are represented in the Tenerife environmental samples. Data from countries such as Brazil (Magliano et al. 2009), France (Thomas et al. 2008), Switzerland (Gianinazzi et al. 2009), South Korea (Jeong et al. 2007), and USA (Booton et al. 2004) have provided supporting evidence for that. However, in Osaka (Japan) (Hsu et al. 2009), the most frequent genotype was T3 (56.8%) and T4 (13.5%); and in Taiwan (Edagawa et al.

2009), *A. griffini* (T3) was the most frequent followed by *Acanthamoeba jacobsi* (T15).

A comparison of the genotypes from strains of clinical origin from this study with those from other studies that investigated multiple AK isolates revealed that our study had the T4/1 and T4/9 in common with France where T4/2 and T4/13 (Yera et al. 2008) were also seen. In Italy, 78% of cases were T4 including T4/1 and T4/9 and 21% were T3 (Di Cave et al. 2009), similarly in China, 94% of AK cases were associated to T4 (T4/1 and T4/9) and to T3 genotypes (6%) (Zhang et al. 2004). However, in USA, although 97.2% of cases were T4, the T4/1 and T4/9 were not represented (Ledee et al. 2009). In Spain, an AK isolate was reported as T4 (Lorenzo-Morales et al. 2007).

The dominance of T4 genotype in the environmental and clinical isolates characterized in this study correlates with the worldwide dominance of this genotype in environmental and AK isolates (Booton et al. 2005; Ledee et al. 2009). Although genotypes found in Spanish clinical strains (T4/1 and T4/9) were comparable to the isolates from other countries, they had a low representation in Spanish environmental isolates (T4/1=8.3%, T4/9=0%). For this reason, we decided to investigate the pathogenic potential of the Spanish strains obtained from finished water of DWTPs, with genotype (T4/8); that was, however, underrepresented in the Spanish clinical strains (11%). The data from the experimental in vivo study suggest that the environmental isolates might be potentially pathogenic to humans with a reduced or impaired immune status because of malnutrition, diabetes, pregnancy, alcoholism, immunosuppressive therapy, and AIDS; all of them considered as risk factors for *Acanthamoeba* infection (Khan 2006). Known risk factor for AK such as poor contact lens hygiene and behaviors such as swimming or showering with contact lenses (Joslin et al. 2007) highlights the importance of the presence of *Acanthamoeba* in domestic water supply. In conclusion, we show for the first time that *Acanthamoeba* T4 genotype is present in a very high percentage (100%) in different types of water samples including tap water and sewage effluents in the central area of Spain suggesting a potential health threat for humans especially for the contact lens wearers.

**Acknowledgments** The authors are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance, to Brian Crilly for helpful revision of the manuscript, to Santiago Angulo for their participation on the discussion of the results, and to Francisco J. Carrillo for help in artwork. We would like to thank Canal Isabel II, especially Carmen Gordo and Joseba Iñaki Urrutia for their help in designing and carrying out the sampling collection and also for their useful discussion of the results. This work was funded by grant PI061593 from Instituto de Salud Carlos III (FISS) and by grant PC 04/07 of the Fundación Universitaria San Pablo CEU. Ana Luz Galvan was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias [Antioquia University (Colombia)]. Angela Magnet was supported by an undergraduate and a predoctoral fellowship from Fundación Universitaria San Pablo CEU.

## References

- US EPA (2005) Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA-821-R-05-002. <http://www.epa.gov/nerlcwww/1623de05.pdf>. United States Environmental Protection Agency, Office of Water Washington, DC 20460
- Acharya NR, Lietman TM, Margolis TP (2007) Parasites on the rise: a new epidemic of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 144(2):292–293
- Arias Fernandez MC, Paniagua Crespo E, Marti Mallen M, Penas Ares MP, Casro Casas ML (1989) Marine amoebae from waters of northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. *J Protozool* 36(3):239–241
- Bonilla-Lemus P, Ramirez-Bautista GA, Zamora-Munoz C, Ibarra-Montes MR, Ramirez-Flores E, Hernandez-Martinez MD (2009) *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the Metropolitan Area of Mexico City. *Exp Parasitol* 126(1):54–58
- Boost M, Cho P, Lai S, Sun WM (2008) Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optom Vis Sci* 85(7):526–530
- Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DS, Byers TJ, Fuerst PA (2002) 18S Ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 40(5):1621–1625
- Booton GC, Rogerson A, Bonilla TD, Seal DV, Kelly DJ, Beattie TK, Tomlinson A, Lares-Villa F, Fuerst PA, Byers TJ (2004) Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J Eukaryot Microbiol* 51(2):192–200
- Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA (2005) Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* 43(4):1689–1693
- Brindley N, Matin A, Khan NA (2009) *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Exp Parasitol* 121(3):254–256
- Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon AP, Rott MB (2009) Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol* 103(6):477–485. doi:10.1179/136485909X451825
- Cruz M, Ortiz JV, Ladron de Guevara C (2004) Estudio clínico-epidemiológico de tres casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. *Enf Emerg* 6(2):98–102
- Chappell CL, Wright JA, Coletta M, Newsome AL (2001) Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(4):724–730
- De Jonckheere JF, Michel R (1988) Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Res* 74(4):314–316
- de Miguel I, Fernando R, Santan OE, Martin-Sanchez AM (1999) *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearing patients. *Inferm Infecc Microbiol Clin* 17:445–448
- Di Cave D, Monno R, Bottalico P, Guerriero S, D'Amelio S, D'Orazi C, Berrilli F (2009) *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(6):607–612
- Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P (2009) Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res* 105(4):1109–1117
- Ettinger MR, Webb SR, Harris SA, McIninch SP, Garman GC, Brown BL (2003) Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res* 89(1):6–15

- Gene AH, Gardner PA, Couce Matovelle ME (2007) Rapidly expanding brain mass. *Transpl Infect Dis* 9(3):211–213
- Gianinazzi C, Schild M, Muller N, Leib SL, Simon F, Nunez S, Joss P, Gottstein B (2005) Organotypic slice cultures from rat brain tissue: a new approach for *Naegleria fowleri* CNS infection in vitro. *Parasitology* 131(Pt 6):797–804
- Gianinazzi C, Schild M, Wuthrich F, Ben Nouir N, Fuchslin HP, Schurch N, Gottstein B, Muller N (2009) Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Res Microbiol* 160(6):367–374
- Hoffmann R, Michel R (2001) Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 203:215–219
- Hsu BM, Ma P, Liou TS, Chen JS, Shih FC (2009) Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from hot spring recreation areas in the central range, Taiwan. *J Hydrol* 367:249–254
- Huang SW, Hsu BM, Chen NH, Huang CC, Huang KH, Chen JS, Kao PM (2011) Isolation and identification of *Legionella* and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR. *Parasitol Res* 109(5):1233–1241
- Jeong HJ, Jang ES, Han BI, Lee KH, Ock MS, Kong HH, Chung DI, Seol SY, Cho DT, Yu HS (2007) *Acanthamoeba*: could it be an environmental host of *Shigella*? *Exp Parasitol* 115(2):181–186
- Jeong HJ, Yu HS (2005) The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean J Parasitol* 43(2):47–50
- John DT, Howard MJ (1995) Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res* 81(3):193–201
- Joslin CE, Tu EY, Shoff ME, Booton GC, Fuerst PA, McMahon TT, Anderson RJ, Dworkin MS, Sugar J, Davis FG, Stayner LT (2007) The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 144(2):169–180
- Khan NA (2006) *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30(4):564–595
- Ledee DR, Iovieno A, Miller D, Mandal N, Diaz M, Fell J, Fini ME, Alfonso EC (2009) Molecular identification of t4 and t5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J Clin Microbiol* 47(5):1458–1462
- Lopez L, de Fernando S, Gaztelurrutia L, Vilar B, Perez-Irezabal J, Barron J (2000) Keratitis caused by *Acanthamoeba* spp.: presentation of 10 cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 18(5):229–233
- Lorenzo-Morales J, Martinez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marin J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B (2007) Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res* 102(1):167–169
- Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jimenez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega-Rivas A (2005a) Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med* 12(2):233–236
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martinez E, Valladares B (2005b) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res* 95(4):273–277
- Lloves M, Lores B, Pascual S, Arias C, Paniagua Crespo E (1996) Isolation of *Acanthamoeba* spp in intensive aquaculture areas of Vigo estuary (N.W. Spain). *Sci Mar* 60(4):549–551
- Madrigal Sesma MJ, Santillana I, Zapatero Ramos L (1982) Presencia de amebas limax en aguas naturales de Madrid. *Revista Iberica de Parasitologia Vol (Extra):124–140*
- Magliano AC, da Silva FM, Teixeira MM, Alfieri SC (2009) Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol* 123(3):231–235
- Mahmoudi MR, Taghipour N, Eftekhari M, Haghghi A, Karanis P (2012) Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitol Res* 110(1):473–477
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16(2):273–307
- Marti Mallen M, Arias Fernandez C, Paniagua Crespo E, Benito Rueda A, Combarro Combarro MP (1986) Identificación de amebas en aguas de ríos de Galicia (España). *Revista Iberica de Parasitologia* 46(4):353
- Paniagua Crespo E, Marti Mallen M, Penas Ares MP, Arias Fernandez MC, Combarro MP (1990) Isolation of amoeba of the genera *Naegleria* and *Acanthamoeba* from public fountains in Galicia (N.W. Spain). *Water Air Soil Pollut* 53(1-2):103–111
- Peman J, Jarque I, Frasquet J, Alberola C, Salavert M, Sanz J, Gomila B, Esteban G (2008) Unexpected postmortem diagnosis of *Acanthamoeba* meningoencephalitis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Transplant* 8(7):1562–1566
- Penas Ares MP, Paniagua Crespo E, Madrinan Choren R, Marti Mallen M, Arias Fernandez MC (1994) Isolation of free living pathogenic amoeba from thermal spas in N.W. Spain. *Water Air Soil Pollut* 78(1-2):83–90
- Perez-Pomata T, Perez-Alvarez MJ, Rodriguez-Zurita ME, Moreno-Lopez M (2006) Keratitis in a person wearing contact lenses. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(4):280–282
- Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ (2006) Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol* 44(10):3589–3595
- Scheid P, Zoller L, Pressmar S, Richard G, Michel R (2008) An extraordinary endocytobiont in *Acanthamoeba* sp. isolated from a patient with keratitis. *Parasitol Res* 102(5):945–950
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ (2001) Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 39(5):1903–1911
- Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34(9):1001–1027
- Seijo Martinez M, Gonzalez-Mediero G, Santiago P, Rodriguez De Lope A, Diz J, Conde C, Visvesvara GS (2000) Granulomatous amoebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol* 38(10):3892–3895
- Shoff ME, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal DV (2008) Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J Water Health* 6(1):99–104
- Stockman LJ, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ (2011) Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA–1990–1992. *Parasitol Res* 108(3):621–627
- Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G (2008) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 10(10):2728–2745
- Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Muller N (2004) The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* 92(5):405–413
- Valster RM, Wullings BA, Bakker G, Smidt H, van der Kooij D (2009) Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 75(14):4736–4746
- Valster RM, Wullings BA, van den Berg R, van der Kooij D (2011) Relationships between free-living protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. *Appl Environ Microbiol* 77(20):7321–7328
- Varela Mato M, Arias Fernandez C, Paniagua Crespo E, Marti Mallen M (1987) Aislamiento de amebas de vida libre a partir de aguas

- embotelladas y manantiales. *Revista Iberica de Parsitología* 47 (2):105
- Verani JR, Lorick SA, Yoder JS, Beach MJ, Braden CR, Roberts JM, Conover CS, Chen S, McConnell KA, Chang DC, Park BJ, Jones DB, Visvesvara GS, Roy SL (2009) National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg Infect Dis* 15(8):1236–1242
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(1):1–26
- Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Viscogliosi E, Noel C, Dupouy-Camet J, Chaumeil C (2008) The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. *Br J Ophthalmol* 92 (8):1139–1141
- Zhang Y, Sun X, Wang Z, Li R, Luo S, Jin X, Deng S, Chen W (2004) Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(6):1904–1907

### **3.2 ESTUDIO 2: A YEAR LONG STUDY OF THE PRESENCE OF FREE LIVING AMOEBA IN SPAIN.**

**A. Magnet**<sup>a</sup>, S. Fenoy<sup>a</sup>, A.L. Galván<sup>a,b</sup>, F. Izquierdo<sup>a</sup>, C. Rueda<sup>a</sup>, C. Fernandez Vadillo<sup>a</sup>, C. del Aguila<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Parasitología, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid ,Spain. <sup>b</sup> Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Publicado en:** Water Research 2013 Dec 1; 47(19): 6966-72.

**doi:** 10.1016/j.watres.2013.09.065

**Índice de impacto:** 4.655

**Categoría JCR:** "Environmental engineering", "Environmental Sciences" y "Water resources"

**Posición dentro de las tres categorías:** 1er tercil



## Resumen

### **“Estudio anual de la presencia de amebas de vida libre en España”.**

Las amebas de vida libre (AVL) como *Acanthamoeba* o *Balamuthia mandrillaris* son amebas anfitoicas que puede actuar como parásitos oportunistas de diferentes vertebrados y que, cada vez más, suponen una amenaza para la salud humana debido a la resistencia de su forma quística en condiciones ambientales desfavorables, en presencia de desinfectantes y diferentes tratamientos del agua así como su distribución cosmopolita.

El objeto del presente trabajo ha sido el estudio de la presencia de estas AVL y su posible estacionalidad en un clima Mediterráneo continental en diferentes tipos de agua. Para ello se tomaron 223 muestras de agua durante un año procedentes de cuatro Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), siete Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDAR) y seis zonas de influencia (ZI) de dichas plantas. Las muestras de agua se concentraron con el sistema IDEXX Filta-Max® y se analizaron por PCR y cultivo. Para el análisis molecular se utilizó una PCR múltiple (*triplex* PCR) en tiempo real que permite analizar la presencia de *Acanthamoeba*, *B. mandrillaris* y *Naegleria fowleri* de forma simultánea.

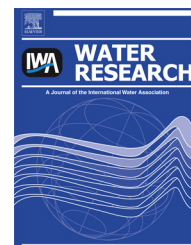
De las tres AVL estudiadas, *N. fowleri* no se detectó ni por PCR ni por cultivo y *B. mandrillaris* se detectó únicamente a la entrada de una ETAP siendo esta la primera descripción de este protozoo en agua. *Acanthamoeba* se detectó por el contrario en un porcentaje muy elevado por PCR (94,6%) y por cultivo (85,2%); lo que se traduce en un 99,1% de muestras positivas por al menos una de las dos técnicas empleadas. Debido a ello, no pudo establecerse estacionalidad para la presencia de *Acanthamoeba* en muestras ambientales. Los aislados de *Acanthamoeba* se caracterizaron como genotipo T4 con nueve secuencias T4/DF3 diferentes, tres de las cuales constituyen la primera cita.

La presencia constante de *Acanthamoeba* a lo largo del año debe servir como nota de atención a los usuarios de lentes de contacto con prácticas higiénicas inadecuadas ya que el riesgo de adquisición de

*Acanthamoeba* es constante a lo largo del año. Así como a los clínicos que deben considerar a esta ameba como posible agente causal en casos de encefalitis y queratitis debido a su elevada presencia en muestras ambientales demostrada en este estudio.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

# A year long study of the presence of free living amoeba in Spain

A. Magnet<sup>a</sup>, S. Fenoy<sup>a</sup>, A.L. Galván<sup>a,b</sup>, F. Izquierdo<sup>a</sup>, C. Rueda<sup>a</sup>,  
C. Fernandez Vadillo<sup>a</sup>, C. del Aguila<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Parasitología, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 March 2013

Received in revised form

5 September 2013

Accepted 26 September 2013

Available online 22 October 2013

### Keywords:

Free-living amoeba

*Acanthamoeba*

*Balamuthia mandrillaris*

Drinking water

Wastewater

Spain

## ABSTRACT

Free-living amoeba such as *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* can act as opportunistic parasites on a wide range of vertebrates and they are becoming a serious threat to human health due to the resistance of their cysts to harsh environmental conditions, disinfectants, some water treatment practices and their ubiquitous distribution. This work was carried out in order to study the presence of these free-living amoebae (FLA) and their possible seasonality in a continental-Mediterranean climate in different types of water. For this purpose, a total of 223 water samples were collected during one year from four drinking water treatment plants (DWTP), seven wastewater treatment plants (WWTP) and six locations of influence (LI) on four river basins from Spain. Water samples were concentrated using the IDEXX Filta-Max<sup>®</sup> system and analyzed by a triplex real time PCR that detects *Acanthamoeba*, *B. mandrillaris* and *Naegleria fowleri*. Agar plates were also seeded for *Acanthamoeba* culture. From the three FLA studied, *N. fowleri* was not detected in any sample while *B. mandrillaris* was found at the entrance of a DWTP; this being, to our knowledge, the first report of these protozoa in water worldwide. On the other hand, the presence of *Acanthamoeba* observed was higher, 94.6% of the studied points were positive by real time PCR and 85.2% by culture, resulting in 99.1% positive for *Acanthamoeba* with both methods. All genetically analyzed *Acanthamoeba* were genotype T4 but nine different T4/DF3 sequences were observed, three of them being described for the first time, assigning new codes. No seasonal distribution of *Acanthamoeba* was found. These facts should serve as a warning to contact lens wearers of the risk of a poor hygiene when handling their contact lenses. It should also serve as a signal to physicians to consider FLA as a possible causative agent of nervous system infections as well as *Acanthamoeba* keratitis due to their high environmental presence shown in this study.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* are the free-living amoeba (FLA) most commonly related with

human diseases. They can be found in different types of water and soil habitats worldwide. *Acanthamoeba* has been isolated from several environments such as freshwater lakes, swimming pools, fresh and salt water, drinking water, contact lens

\* Corresponding author. Tel.: +34 913724770.

E-mail address: [cagupue@ceu.es](mailto:cagupue@ceu.es) (C. del Aguila).

washing solutions, ventilation systems, dialysis apparatus and soil among others (Booton et al., 2005; Visvesvara et al., 2007). Both *B. mandrillaris* and *Acanthamoeba* can cause an infection in the Central Nervous System (CNS) called granulomatous amoebic encephalitis (GAE) as well as lung and skin infections (Visvesvara et al., 2007). *N. fowleri* also causes a CNS infection, primary amoebic meningoencephalitis (PAM), that leads in most cases to the death of the patient within a few days (Visvesvara et al., 2007). On the other hand, *Acanthamoeba* can produce *Acanthamoeba* keratitis (AK), an infection of the cornea that may lead to partial or complete loss of vision (Visvesvara et al., 2007). This infection is becoming more common in industrialized countries due to the increased use of contact lenses and poor handling habits that are some of the risk factors associated with this pathology (Joslin et al., 2007; Verani et al., 2009; Visvesvara et al., 2007). To date, in Spain, only 24 AK cases has been described (Cruz et al., 2004; de Miguel et al., 1999; Lopez et al., 2000; Lorenzo-Morales et al., 2007; 2011; Magnet et al., 2012; Perez Pomata et al., 2006), two of them in the last two years. Granulomatous amoebic encephalitis due to *Acanthamoeba* is a less common infection but worldwide an estimate 400 cases have been described, three of them reported in Spain (Blanco et al., 2012; Gene et al., 2007; Pemán et al., 2008; Seijo Martinez et al., 2000). Environmental studies on FLA epidemiology are scarce in Spain and most of them have been carried out on *Acanthamoeba* on the island of Tenerife, where high concentrations of this amoeba in fresh (59%) and salt water (40%) have been detected (Lorenzo-Morales et al., 2005a,b). Recently, a short study in the central area of Spain, a Continental Mediterranean climate zone, was carried out in drinking water treatment plants (DWTP), wastewater treatment plants (WWTP) and different environmental waters such as reservoirs and rivers. In this study neither *B. mandrillaris* nor *N. fowleri* were detected but a high presence of *Acanthamoeba* was observed (96.4%) (Magnet et al., 2012). There was also a previous study in Spain where *Acanthamoeba* was detected in 2 of 12 finished water samples from three DWTP (Corsaro et al., 2010). Even though the presence of *Acanthamoeba* has been described worldwide and in a great variety of environments, its possible seasonality has not yet been studied in different climates. To our knowledge, there is only one report from a subtropical climate zone, Tulsa (Oklahoma, USA) (John and Howard, 1995), where a year-round study was carried out. In this case, samples were collected monthly during one year from a stock pond, a woodland pond and an ornamental golf-course, and they found that *Acanthamoeba* tends to be isolated in spring and early summer. This peak in *Acanthamoeba* environmental distribution correlates with AK peaks described by Mathers et al. (1998) in a four-year study in a similar climate zone, Iowa (USA).

In the case of *Naegleria* sp. epidemiology, there are a few reports of its presence in Spain; it has been found in a river in the south of Spain (Mascaro et al., 1981) and isolated from the intestinal contents of reptiles (Sesma and Ramos, 1989). To our knowledge there have been no report of *B. mandrillaris* in Spain but one clinical case has been reported in a patient with meningoencephalitis in Portugal (Tavares et al., 2006).

Due to the lack of knowledge about *Acanthamoeba*'s epidemiology in a Continental Mediterranean climate, the aim

of the present work was to increase its epidemiological knowledge during one year sampling (2008) in different types of water.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Water samples from Castilian Plateau (Spain) were evaluated to characterize the presence of FLA. Four river basins were selected in which 17 sampling points were chosen. These points included four drinking water treatment plants (DWTP), one in each river basin; seven wastewater treatment plants (WWTP), and six locations of influence (LI), one on the edge of a river, two reservoirs and three gauging stations, located upstream and downstream of the water plants. In the DWTP selected, the treatments followed are: preoxidation, prechlorination, coagulation, flocculation, decantation, sand filtration and disinfection with ozone and/or chloramines. For the WWTP, physicochemical and biological treatments are used with activated sludge. Water samples were obtained following protocol 1623 described by US EPA. For the DWTP, up to 100 L of water were collected from each site (raw water – at the entrance of the plant – and finished water – at the exit of the plant). For WWTP, up to 50 L were collected at both points as above and for the 6 LI up to 50 L. The sampling scheme therefore included the collection of 223 water samples from all the areas under study during the four seasons of 2008, sampling twice in each season (one sample from DWTP 3 could not be included due to processing problems). In all cases water samples were concentrated using IDEXX<sup>®</sup> Filta Max system following manufacturer's instructions. A total of 7 ml were finally eluted from each concentrated sample and fractioned for different analysis. Samples for molecular analysis were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. *Acanthamoeba* culture

For *Acanthamoeba* isolation, 80  $\mu\text{l}$  of the concentrated water samples were inoculated onto 2% Neff's saline non-nutrient agar (NNA) plates seeded with heat-killed *Escherichia coli* and incubated at  $28^{\circ}\text{C}$ . Cultures were monitored daily and sub-cultured by transferring small pieces of agar containing *Acanthamoeba* to a fresh plate (Magnet et al., 2012).

### 2.3. Molecular methods

#### 2.3.1. DNA extraction

DNA from water samples were extracted using DNAeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (QUIAGEN, USA) following manufacturer's instructions. These extracted DNA were purified with QIAquick PCR kit (Qiagen, USA).

#### 2.3.2. Real-time PCR assay

A triplex real time-PCR designed to simultaneously detect *Acanthamoeba* sp., *B. mandrillaris* and *N. fowleri* was used (Qvarnstrom et al., 2006). PCR amplifications were performed following cycling conditions and structure as described elsewhere (Qvarnstrom et al., 2006) and for every PCR run, positive



**Table 2 – Variety of *Acanthamoeba* sp. genotypes obtained in the different sampling points.**

Season	Sampling point	Genotype
Spring	DWTP 1 fs FW*	T4/8
	DWTP 1 ss FW	T4/8
	DWTP 1.2 ss RW*	T4/8
	DWTP 1.2 ss FW*	T4/1
	LI 1.1 ss	T4/8
	LI 1.2 ss*	T4/8
	LI 1.3 ss	T4/22
	DWTP 2 fs RW*	T4/8
	LI 2 ss*	T4/8
	DWTP 3 ss FW*	T4/8
	WWTP 3 fs FW	T4/8
	WWTP 3 ss FW	T4/22
	LI 3 ss	T4/8
	DWTP 4 fs FW	T4/8
	DWTP 4 ss RW	T4/25
	DWTP 4 ss FW*	T4/8
	WWTP 4.1 fs FW	T4/8
	WWTP 4.1 ss RW	T4/8
	WWTP 4.1 ss FW*	T4/8
	WWTP 4.2 ss RW*	T4/8
	WWTP 4.2 ss FW*	T4/8
	WWTP 4.3 ss FW*	T4/13
	LI 4	T4/8
Summer	DWTP 1 fs FW	T4/1
	DWTP 2 fs RW	T4/8
	DWTP 2 fs FW	T4/8
	DWTP 3 ss RW	T4/9
	DWTP 3 ss FW	T4/22
	WWTP 3 fs RW	T4/8
	DWTP 4 ss FW	T4/23
	WWTP 4.2 fs RW	T4/12
	WWTP 4.3 fs RW	T4/13
WWTP 4.3 fs FW	T4/8	
Autumn	WWTP 1.1 ss RW	T4/24
	WWTP 2 ss FW	T4/8
	LI 2 fs	T4/8
Winter	LI 4 fs	T4/22
	DWTP 3 fs FW	T4/22
	WWTP 1.1 FW	T4/13

DWTP: Drinking water treatment plant; WWTP: Wastewater treatment plant; LI: Location of Influence. fs: first sampling, at the beginning of the season. ss: second sampling, at the end of the season. RW: raw water; FW: finished water \* Described previously (Magnet et al., 2012).

**Table 3 – Results of *Acanthamoeba* sp. genotype.**

Genotype	+/nt	%
T4/1	2/39	5.1
T4/8	24/39	61.5
T4/9	1/39	2.6
T4/12	1/39	2.6
T4/13	3/39	7.7
T4/22	5/39	12.8
T4/23	1/39	2.6
T4/24	1/39	2.6
T4/25	1/39	2.6

+/nt: positive sample/total of samples genotyped; %: percentage of positivity.

very slowly and can be easily overgrown with other environmental organisms such as fungi or other amoebae (Schuster et al., 2003). Furthermore, our findings correspond only to the results of the taq-man probes based real time-PCR so its viability could not be established.

In relation to the presence of *Acanthamoeba* during one year, it was detected in 211 out of the 223 (94.6%) samples studied by real time-PCR and in 190 (83.9%) studied by culture, showing PCR to be a more sensitive technique. Despite it being well-known that the molecular methods, such as real time-PCR, are more sensitive than culture, Huang and Hsu (2010) noted a better sensitivity with culture (15.4%) than PCR (9.6%) when analyzing raw water and river water. Moreover, in our study, the individual analysis of the samples revealed that 40 of them were only positive by one of the two methods studied. Based on these studies, the need for the use of both methods, PCR and culture, for environmental samples is suggested in order to obtain a more complete view of the real presence of *Acanthamoeba*. Independent of the methodology used to detect these protozoa, epidemiological studies worldwide in different types of water showed a lower presence of *Acanthamoeba* than the one observed in our study. Its presence ranges from 2.8% in Florida (USA) (Shoff et al., 2008) to 61% in Bulgaria (Tsvetkova et al., 2004). Differences in the presence of *Acanthamoeba* could be related to the sampling and processing methods used, since, to date, there is no agreement on the methodology that should be followed to concentrate these parasites from water. Methodology varies from a cotton swab scrape of an area two-inch square (Shoff et al., 2008); to different sample volumes (50 ml–2 L) centrifuged or filtered (Edagawa et al., 2009; Gianinazzi et al., 2009; Jeong and Yu, 2005; Lorenzo-Morales et al., 2005a; Magliano et al., 2009; Tsvetkova et al., 2004). In this study, between 50 L to 100 L were collected and concentrated with IDEXX Filta® Max system. As it has been shown, it is necessary to standardize a sampling method for the search of FLA in environmental samples that would let us compare their presence in the environment in different countries.

In the present study, samples from DWTP and WWTP showed *Acanthamoeba* to be present in raw and finished water by culture and real time-PCR. This fact indicates that the treatment followed in these plants is not effective in the elimination of *Acanthamoeba*. Furthermore, in one DWTP, the presence of *Acanthamoeba* was detected only in finished water

#### 4. Discussion

To date, *B. mandrillaris* has been isolated only from soil or dust (Ahmad et al., 2011; Dunnebacke et al., 2004; Niyati et al., 2009; Schuster et al., 2003) but reports of GAE caused by this parasite have increased in the last ten years and it is now being considered as an emerging disease (Bravo et al., 2011). In Spain, there have been no reports of this pathology; however we have to bear in mind that this FLA has been detected in Portugal as the etiological agent of GAE in an infant (Tavares et al., 2006). Thus, the detection of *B. mandrillaris* for the first time in water (Gianinazzi et al., 2009, 2010), would not be strange due to the geographical closeness of both countries. Its isolation in axenic culture was not possible since it grows

```

*          * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
T4/1  GGTGCGGTCG TCCTTGCCGT C-TCGGTCCT TCACGGGGCC GGGG-CGCGG GGGCGGC--- TTAGCCCGG
T4/8  GGTGCGGTCG TCCTTGCCGT C-TCGGTCCT TCACGGGGCC GGGG-CGCGG GGTGTCG--- TTAGCCCGG
T4/9  GGTGCGGTCG TCCTTGCCGT C-TCGGT--T TC---GGCC GGGG-TGCGG GGA-GGC--- TTAGCCCGG
T4/12 GGC GCGGTCG TCCTTGCCGT -GTCTCGGCT TCAC--GGCT GGGG-CGCGC G-AGGGCGGT TTAGCCCGG
T4/13 GGC GCGGTCG TCCTTGCCGT C-TCGGTCCT TCACGGGGCC GGGG-CGCGG GGGCGGC--- TTAGCCCGG
T4/22 GGC GCGGTCG TCCTTGCCGT C-TCGGTCCT TCACGGGGCC GGGG-CGCGA GGGCGGC--- TTAGCCCGG
T4/23 GGC GCGGTCG TCCTTGCCGT TGTGCG--CT TCAC--GGCT GCGGCGCGA GGGCGG---T TTAGCCCGG
T4/24 GGC GCGGTCG TCCTTGCCGT -GTCAG--CT TCAC--GGCT GCGG-CGCGA GGGCGG---T TTAGCCCGG
T4/25 GGTGCGGTCG TCCTTGCCGT C-TCGGT--T TC---GGCC GGGG-CGCGG GGATGGC--- TTAGCCCGG

```

**Fig. 1** – Primary sequence alignment of a subset area of the DF3 that contains the highly variable and informative section of this fragment of the studied isolates. Asterisks denote variable positions; gaps are represented by dashes.

but not at the entry point. This fact has been described previously by [Thomas and Ashbolt \(2011\)](#), who pointed out that the presence of FLA in the effluents of treatment plants could be due not only to their resistance to the treatments but also to the fact that they can continue growing in the different conduits of the plants, probably sheltered in biofilms. This can also be corroborated with the results of the DF3 sequences found at the entry and exit of some plants in which the types found in raw and finished water were different ([Table 2](#)). These amoebae are known as coprophilic organisms ([Schuster and Visvesvara, 2004](#)) and these plants provide a good ecosystem for them. In the LI, most of them situated downstream from WWTP, the presence of *Acanthamoeba* was detected during all season studied, demonstrating for the first time the high level of environmental contamination of these parasites during a year long study.

Even though a high presence of *Acanthamoeba* is described, it is important to note that although the European Drinking Water Directive (Directive 98/83/CE) states that water intended for human consumption should not contain pathogenic microorganisms, water sanitary quality regulation is based only on the determination of fecal bacteria indicators. In Spain, in relation to protozoa presence in water, there is only a guideline for *Cryptosporidium* detection in drinking water (Real Decreto from Spanish Law 140/2003). Regarding wastewater, there is no specific regulation on protozoa presence in the current European environmental directive for sewage sludge (Directive 86/278/EEC). To our knowledge the only guideline that picks *Acanthamoeba* as a waterborne pathogen is the Australian Government National Water Quality Management Strategy Guidelines, but no guidelines values for *Acanthamoeba* are proposed due to the given uncertainty about infection sources (water, dust, soil...). Nevertheless in this same Strategy Guidelines, the need of *Acanthamoeba* control in specialized uses of water such as distribution in hospitals, renal dialysis or industrial eye-wash stations is pointed out.

To date, only one study has been carried out in DWTPs throughout a year on the presence of *Acanthamoeba* ([Corsaro et al., 2010](#)). Nevertheless, no geographical location or sampling/timing scheme was described, so no conclusions about seasonality or climate correlations were made. On the contrary, an annual study of FLA presence in different ponds in Tulsa (USA) described *Acanthamoeba* seasonality ([John and Howard, 1995](#)). Our results differ with this study where *Acanthamoeba* tended to be isolated in spring and early summer. The area studied by this group corresponded with a subtropical climate while, in the case of the Madrid area, a

Continental Mediterranean climate is experienced. Considering only the temperatures of both zones, differences of *Acanthamoeba* presence could not be explained, as low and high average temperatures in both cities are very similar. It is important to notice that weather disruptions in Madrid are very rare even in the rainy seasons while, on the contrary, Tulsa is situated near Tornado Alley where severe thunderstorms containing large hail, strong winds, and occasionally, tornadoes occur specially in summer. The decrease in amoebae presence (July–September) described in Tulsa ([John and Howard, 1995](#)) corresponds with these extreme weather disruptions. Bearing in mind that *Acanthamoeba* has been isolated from water with temperatures ranging from 6 °C to 42 °C ([John and Howard, 1995](#)) we could suspect that the constant presence of *Acanthamoeba* in environmental samples (LI and entry of DWTP) from Madrid could be related to the absence of weather disruptions and not to the temperatures changes. In the case of the exit points of the treatment plants, the constant presence of *Acanthamoeba*, as previously mentioned, could be related more to their possible growth inside the plants, than to the weather changes. Seasonal distribution of *Acanthamoeba* demonstrated by the Tulsa study, has been correlated to AK peaks by [Mathers et al. \(1998\)](#) in Iowa, where climate conditions are similar. On the other hand, in regions such as Turkey, northern Italy, central Chile or central Argentina where the weather is similar to that in Madrid, AK and GAE cases have been described ([Astorga et al., 1993](#); [Di Cave et al., 2009](#); [Ertabaklar et al., 2007](#); [Gertiser et al., 2010](#)) but no seasonality of the onset of the symptoms has been established. If we extrapolate our results to similar countries we can suggest that no seasonal correlation will be observed in clinical manifestations. This is an important fact because the risk of *Acanthamoeba* acquisition is constant through the whole year.

Many different tests have been proposed to determine environmental *Acanthamoeba* pathogenicity but there is still no consensus. Some tests such as thermotolerance or osmotolerance are used; however, for AK, it is known that these are not as critical as they are for Central Nervous System infections, because the corneal surface temperature is slightly below normal mammalian body temperature ([Schuster and Visvesvara, 2004](#)). Following this idea, [Michel and Menn \(1991\)](#) described some environmental isolates that were unable to grow at 40 °C but were pathogenic to mice and that the vast majority of thermotolerant amoebae were not pathogenic ([John and Howard, 1995](#)). Species or genotypes have also been correlated to possible pathogenicity; *Acanthamoeba* T4 is the

one most associated with AK (Schuster and Visvesvara, 2004) and it is also the one most commonly found in the environment (Booton et al., 2005; Ledee et al., 2009) and the only one reported in our study. Only genotypes T4/1, T4/9 and T4/13 from water have been described in AK infections (Di Cave et al., 2009; Lorenzo-Morales et al., 2007; Magnet et al., 2012; Yera et al., 2008; Zhang et al., 2004). Nevertheless, it is important to highlight that the genotype most common in our study was T4/8 which has been reported as a potential pathogenic following *in vivo* studies (Magnet et al., 2012). Although T4/DF3 regions have been described in clinical samples, the possible pathogenicity associated with these types needs more studies. The DF3 sequences in this study have been shown to be a useful tool for environmental epidemiology as we have seen differences in *Acanthamoeba* types at the entrance and exit points of the treatment plants that with the morphology or 18S genotypes which would otherwise never have been detected.

## 5. Conclusions

- As *Acanthamoeba* has been found throughout the year and at the exit points of the DWTPs studied, it is important to highlight that the risk of *Acanthamoeba* acquisition is present during the whole year.
- The usefulness of the T4/DF3 sequences for molecular epidemiology studies of *Acanthamoeba* has been shown.
- *Balamuthia mandrillaris* was found for the first time in water.

## Acknowledgments

The authors are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance; Dr. da Silva and Dr. Visvesvara for their discussion of the results and to Sara Kohgadai and Brian Crilly for their helpful revision of the manuscript. This work was funded by grant PI061593 from Instituto de Salud Carlos III (FISS) and FEDER and by grant PC 04/07 of the Fundación Universitaria San Pablo CEU. Ana Luz Galván was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias (Universidad de Antioquia, Colombia). Angela Magnet was supported by Ministerio de Educación y Ciencia-Spain (FPU grant AP2009-0415).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.065>.

## REFERENCES

Ahmad, A.F., Andrew, P.W., Kilvington, S., 2011. Development of a nested PCR for environmental detection of the pathogenic free-living amoeba *Balamuthia mandrillaris*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58 (3), 269–271.

- Astorga, B., Kustersch, C., Weitz, J.C., 1993. The first isolation in Chile of a free life amoeba in a user of contact lenses with severe keratitis. *Rev. Med. Chile* 121 (11), 1340–1341.
- Blanco, M.J., Catalán, G., López, J.I., Magnet, A., del Aguila, C., Pomposo, I., Montejo, M., 2012. Hemiparesia izquierda en paciente diabético: encefalitis granulomatosa crónica por *Acanthamoeba*. *Rev. Neurol.* 56 (3), 187–188.
- Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S., Byers, T.J., Fuerst, P.A., 2002. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 40 (5), 1621–1625.
- Booton, G.C., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelly, D.J., Fuerst, P.A., 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 43 (4), 1689–1693.
- Bravo, F.G., Alvarez, P.J., Gotuzzo, E., 2011. *Balamuthia mandrillaris* infection of the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24 (2), 112–117.
- Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F., Greub, G., 2010. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213 (3), 158–166.
- Cruz, M., Ortiz, J.V., Ladron de Guevara, C., 2004. Clinical-microbiological study of three cases of keratitis caused by *Acanthamoeba* spp. *Enferm. Emerg.* 6 (2), 98–102.
- de Miguel, I., Ferrando, R., Santan, O.E., Marin-Sanchez, A.M., 1999. Keratitis caused by *Acanthamoeba* in patients with contact lenses. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 17, 445–447.
- Di Cave, D., Monno, R., Bottalico, P., Guerriero, S., D'Amelio, S., D'Orazi, C., Berrilli, F., 2009. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (6), 607–612.
- Dunnebacke, T.H., Schuster, F.L., Yagi, S., Booton, G.C., 2004. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology* 150 (Pt 9), 2837–2842.
- Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusuhara, Y., Karanis, P., 2009. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol. Res.* 105 (4), 1109–1117.
- Ertabaklar, H., Turk, M., Dayanir, V., Ertug, S., Walochnik, J., 2007. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol. Res.* 100 (2), 241–246.
- Gene, A.H., Gardner, P.A., Couce Matovelle, M.E., 2007. Rapidly expanding brain mass. *Transpl. Infect. Dis.* 9 (3), 211–213.
- Gertiser, M.L., Giagante, E., Sgattoni, E., Basabe, N., Rivero, F., Lujan, H., Occhionero, M., Paniccia, L., Visciarelli, E., Costamagna, S.R., 2010. *Acanthamoeba* sp. keratitis: first case confirmed by isolation and molecular typification in Bahía Blanca, Buenos Aires Province, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 42 (2), 122–125.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Wuthrich, F., Ben Nour, N., Fuchslin, H.P., Schurch, N., Gottstein, B., Muller, N., 2009. Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 160 (6), 367–374.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Zumkehr, B., Wuthrich, F., Nuesch, I., Ryter, R., Schurch, N., Gottstein, B., Muller, N., 2010. Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp. Parasitol.* 126 (1), 45–53.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Huang, S.W., Hsu, B.M., 2010. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using

- culture enrichment combined with PCR. *Acta Trop.* 115 (3), 282–287.
- Jeong, H.J., Yu, H.S., 2005. The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean J. Parasitol.* 43 (2), 47–50.
- John, D.T., Howard, M.J., 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol. Res.* 81 (3), 193–201.
- Joslin, C.E., Tu, E.Y., Shoff, M.E., Booton, G.C., Fuerst, P.A., McMahon, T.T., Anderson, R.J., Dworkin, M.S., Sugar, J., Davis, F.G., Stayner, L.T., 2007. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 144 (2), 169–180.
- Ledee, D.R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., Fell, J., Fini, M.E., Alfonso, E.C., 2009. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J. Clin. Microbiol.* 47 (5), 1458–1462.
- Lopez, L., de Fernando, S., Gaztelurrutia, L., Vilar, B., Perez-Irezabal, J., Barron, J., 2000. Keratitis caused by *Acanthamoeba* spp.: presentation of 10 cases. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 18 (5), 229–233.
- Lorenzo-Morales, J., Martinez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marin, J., Bahaya, Y., Walochnik, J., Valladares, B., 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol. Res.* 102 (1), 167–169.
- Lorenzo-Morales, J., Monteverde-Miranda, C.A., Jimenez, C., Tejedor, M.L., Valladares, B., Ortega-Rivas, A., 2005a. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12 (2), 233–236.
- Lorenzo-Morales, J., Morcillo-Laiz, R., Martin-Navarro, C.M., Lopez-Velez, R., Lopez-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Maciver, S.K., Valladares, B., Martinez-Carretero, E., 2011. *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain. *Contact Lens Anterior Eye* 34 (2), 83–86.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E., Valladares, B., 2005b. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol. Res.* 95 (4), 273–277.
- Magliano, A.C., da Silva, F.M., Teixeira, M.M., Alfieri, S.C., 2009. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp. Parasitol.* 123 (3), 231–235.
- Magnet, A., Galvan, A.L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C., Perez-Irezabal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G.S., da Silva, A.J., del Aguila, C., 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol. Res.* 111 (1), 383–392.
- Mascaro, C., Fluvia, C., Osuna, A., Guevara, D., 1981. Virulent *Naegleria* sp. isolated from a river in Cadiz (Spain). *J. Parasitol.* 67 (4), 599.
- Mathers, W.D., Sutphin, J.E., Lane, J.A., Folberg, R., 1998. Correlation between surface water contamination with amoeba and the onset of symptoms and diagnosis of amoeba-like keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* 82 (10), 1143–1146.
- Michel, R., Menn, T., 1991. *Acanthamoeba*, *Naegleria* and invertebrates in wet areas of physiotherapy equipment in hospitals. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 191 (4), 423–437.
- Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaeian, M., Martin-Navarro, C.M., Hagh, A.M., Maciver, S.K., Valladares, B., 2009. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitol. Res.* 106 (1), 279–281.
- Pemán, J., Jarque, I., Frasset, J., Alberola, C., Salavert, M., Sanz, J., Gomila, B., Esteban, G., 2008. Unexpected postmortem diagnosis of *Acanthamoeba* meningoencephalitis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am. J. Transplant.* 8 (7), 1562–1566.
- Perez Pomata, T., Perez Alvarez, M.J., Rodriguez Zurita, M.E., Moreno Lopez, M., 2006. Keratitis in a person wearing contact lenses. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24, 280–282.
- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R., da Silva, A.J., 2006. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (10), 3589–3595.
- Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 2001. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39 (5), 1903–1911.
- Schuster, F.L., Dunnebacke, T.H., Booton, G.C., Yagi, S., Kohlmeier, C.K., Glaser, C., Vugia, D., Bakardjiev, A., Azimi, P., Maddux-Gonzalez, M., Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., 2003. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amoebic encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 41 (7), 3175–3180.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004. Amoebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet. Parasitol.* 126, 91–120.
- Seijo Martinez, M., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodriguez de Lope, A., Diz, J., Conde, C., Visvesvara, G.S., 2000. Granulomatous amoebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 38 (10), 3892–3895.
- Sesma, M.J., Ramos, L.Z., 1989. Isolation of free-living amoebas from the intestinal contents of reptiles. *J. Parasitol.* 75 (2), 322–324.
- Shoff, M.E., Rogerson, A., Kessler, K., Schatz, S., Seal, D.V., 2008. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J. Water Health* 6 (1), 99–104.
- Tavares, M., Correia da Costa, J.M., Carpenter, S.S., Santos, L.A., Afonso, C., Aguiar, A., Pereira, J., Cardoso, A.L., Schuster, F.L., Yagi, S., Sriram, R., Visvesvara, G.S., 2006. Diagnosis of first case of *Balamuthia* amoebic encephalitis in Portugal by immunofluorescence and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44 (7), 2660–2663.
- Thomas, J.M., Ashbolt, N.J., 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ. Sci. Technol.* 45 (3), 860–869.
- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M.S., Muller, N., 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 92 (5), 405–413.
- Verani, J.R., Lorick, S.A., Yoder, J.S., Beach, M.J., Braden, C.R., Roberts, J.M., Conover, C.S., Chen, S., McConnell, K.A., Chang, D.C., Park, B.J., Jones, D.B., Visvesvara, G.S., Roy, S.L., 2009. National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (8), 1236–1242.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50 (1), 1–26.
- Yera, H., Zamfir, O., Bourcier, T., Viscogliosi, E., Noel, C., Dupouy-Camet, J., Chaumeil, C., 2008. The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. *Br. J. Ophthalmol.* 92 (8), 1139–1141.
- Zhang, Y., Sun, X., Wang, Z., Li, R., Luo, S., Jin, X., Deng, S., Chen, W., 2004. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1904–1907.



**3.3 ESTUDIO 3: VECTORIAL POTENTIAL OF ACANTHAMOEBA IN LEGIONELLA  
PROPAGATION IN WATER FOR HUMAN USE.**

**A. Magnet**<sup>a</sup>, R.H.S. Peralta<sup>a,b</sup>, TS. Gomes<sup>a</sup>, F. Izquierdo<sup>a</sup>, C. Fernandez-Vadillo<sup>a</sup>,  
AL. Galvan<sup>a,c</sup>, C. Pelaz<sup>d</sup>, S. Fenoy<sup>a</sup> and C. del Águila<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Parasitología, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid, Spain; <sup>b</sup> Departamento de Patología, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil; <sup>c</sup> Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; <sup>d</sup> Laboratorio de *Legionella*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

**Enviado para publicación en:** Science of the Total Environment

**Índice de impacto:** 3.258

**Categoría JCR:** "Environmental Sciences"

**Posición dentro de su categoría:** 1er tercil



## Resumen

### **“Posible papel vectorial de *Acanthamoeba* en la transmisión de *Legionella* en aguas destinadas al uso humano”.**

*Legionella* spp., una bacteria gram negativa, es el agente causal de la legionelosis, una patología pulmonar que se trasmite a través de aerosoles contaminados con dicha bacteria fundamentalmente desde diferentes instalaciones de sistemas acuáticos. La resistencia de *Legionella* a los tratamientos de desinfección del agua está íntimamente ligada a su interacción con protozoos ambientales especialmente amebas de vida libre (AVL) y más concretamente *Acanthamoeba*. Debido a que España es uno de los países con una mayor tasa de notificación de legionelosis y a la elevada presencia de *Acanthameoba* en este país, los objetivos del presente trabajo fueron i) estudiar la coexistencia de estas bacterias y protozoos en diferentes tipos de agua así como su interacción y, ii) estudiar la utilidad del co-cultivo de muestras ambientales en *Acanthamoeba* para favorecer la detección de *Legionella* en dichas muestras.

Para ello se tomaron 70 muestras en otoño e invierno de 2011 de tres Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), tres Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDAR) y cinco baños naturales (BN) de la meseta Central. Utilizando PCR en tiempo real, un 87,1% de las muestras (61/70) fueron positivas para *Acanthamoeba* y por cultivo un 85,7% (30/70). Mientras que para *Legionella* la detección fue menor; por PCR del concentrado de agua se obtuvo un 58,6% (41/70) de positividad, por cultivo en agar 5,7% (4/70) y por co-cultivo en *Acanthamoeba* un 75,7% (53/70). Además, se estudió la presencia de *Legionella* en el interior de los 54 aislados de *Acanthamoeba* detectándose en 43 de ellos. Indistintamente de la técnica utilizada para la detección de *Legionella*, se identificaron las siguientes especies: *Legionella feeleii*, *L. birminghamensis*, *L. gresilensis/berliardensis*, *L. fairfieldensis*, *L. drozanski* y *L. falloni*; considerándose únicamente como patógena para el hombre *L. feeleii*.

Estos resultados muestran una alta infección de *Acanthamoeba* por *Legionella* en el medio ambiente que, unido a la patogenicidad *per se* de este

protozoo y a su alta resistencia a los tratamientos de desinfección ponen de manifiesto la necesidad de buscar sistemas de tratamiento de agua capaces de eliminar a *Acanthamoeba* y, por tanto, también a las bacterias que transporta en su interior.

Por otro lado, el cultivo de *Legionella* en *Acanthamoeba* se presenta como un método eficaz para la detección ambiental de esta bacteria en concentraciones por debajo del límite de detección del cultivo en agar.

**Vectorial role of *Acanthamoeba* in *Legionella* propagation in water for human use.**

**A. Magnet<sup>a,b</sup>, R.H.S. Peralta<sup>a,c</sup>, TS. Gomes<sup>a</sup>, F. Izquierdo<sup>a,b</sup>, C. Fernandez-Vadillo<sup>a</sup>, AL. Galvan<sup>a,d</sup>, MJ. Pozuelo<sup>a</sup>, C. Pelaz<sup>e</sup>, S. Fenoy<sup>a,b</sup> and C. del Águila<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid, Spain; <sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid, Spain; <sup>c</sup> Departamento de Patología, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil; <sup>d</sup> Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; <sup>e</sup> Laboratorio de *Legionella*, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

\*Corresponding author e-mail: [cagupue@ceu.es](mailto:cagupue@ceu.es); telephone number: +34913724770; fax number: +34913510496

**Abstract:**

*Legionella* spp. is the causative agent of Legionnaires' disease and is transmitted through aerosols emanating from man-made water systems. *Legionella* resistance to water treatments has been related to its association with environmental amoebae such as *Acanthamoeba*. Due to the high presence of this protozoon in Spain and the high rate of notification of Legionnaires' disease of this country, the aims of this work was to study the coexistence of these bacteria and protozoa in water as well as their interaction. The usefulness of *Acanthamoeba* co-culture for the isolation of environmental *Legionella* was also studied. For this purpose, 70 water samples were collected in 2011 from three Drinking Water Treatment Plants, three Wastewater Treatment Plants and five Natural Pools in Spain. *Acanthamoeba* was found by PCR in 87.1% (61/70) samples and, by culture in 85.7% (60/70) samples. *Legionella* was detected by PCR in 58.6% (41/70) of water samples, in 5.7% (4/70) by agar culture and 75.7% (53/70) by *Acanthamoeba* co-culture. From the 54 *Acanthamoeba* water isolates, *Legionella* was detected in 43 of them independently of *Acanthamoeba*'s genotype (T3, T4 and T11). *Legionella* *feeleeii*, *L. birminghamiensis*, *L. gresilensis/berliardensis*, *L. fairfieldensis*, *L. drozanski* and *L. falloni* were identified. In conclusion, our results showed that

environmental *Acanthamoeba* is infected by *Legionella* to a high percentage, and due to its ubiquity, high resistance and its pathogenic potential *per se*, new methods for its elimination should be studied. Also, the high effectivity of *Acanthamoeba* co-culture for *Legionella* detection has been shown.

**KEY WORDS:** *Acanthamoeba*, *Legionella*, *L. feeleii*, drinking water, wastewater, natural pool.

## 1. Introduction:

*Legionella* spp, a gram negative bacterium, is the causative agent of Legionnaires' disease, which is not transmitted from human to human but through *Legionella* – contaminated aerosols emanating from man-made water systems (ECDC, 2011). Up to 4% of community-acquired pneumonia (CAP) and nosocomial pneumonia are due to *Legionella*. In the case of CAP, Legionnaires' disease can lead to hospitalization and has been associated with a case fatality of 9-13% (ECDC, 2011). The most recent European surveillance in 2009, described 5185 Legionnaires' disease cases in Europe being 5144 due to *Legionella pneumophila*, 23 to mixed infections, eight due to other *Legionella* and 33 of unknown species that led in 17 cases to death. Among the 27 EU/EEA countries that participated in this surveillance, Spain had the second highest notification rate (26.9 cases/million) and the one with the most reported cases (ECDC, 2011). In this same year, Spain was the 3<sup>rd</sup> country with travel – associated legionellosis after Italy and France presenting nine clusters, two of them being associated with reoffending sites (sites where more than two clusters took place with two or more years separating the first outbreak from the second one).

From 1999 to 2009, 501 clusters of legionellosis were described in Spain, corresponding to 3402 cases. Of these, 2918 (86%) needed hospitalization and 138 died. The source of infection was unknown for 278 (55.5%) of the clusters; while others were related to sanitary water, refrigeration towers, baths and humidifiers and open water pools.

*Legionella* is a highly resistant bacteria that can survive at temperatures of 0 -63°C and a pH range of 5 - 9.32 (Huang *et al.*, 2011). Despite *Legionella* showing a long-term survival in sterile tap water, its proliferation has been described as dependent on its relationships with other microorganisms (Rowbotham, 1980). Moreover, its virulence, growth and survival in the environment are enhanced by their ability to form symbiotic relationship with other microorganisms. *Legionella* can incorporate and intracellularly replicate into at least 13 species of amoebae like *Acanthamoeba* and *Naegleria* and some ciliates, producing vesicles that contain hundreds of these bacteria (Lee

& West, 1991). The rapid re-colonization of *Legionella* of different water systems after a disinfection program can be attributed to the protective shield that this amoeba provides to the bacteria. Furthermore, there is convincing evidence that intracellular multiplication of *L. pneumophila* in free-living amoebae is a prerequisite for the infection of humans (Molmeret *et al.*, 2005). Similar to other Amoeba Resistant Bacteria (ARB), *Legionella* can be difficult to grow and isolate in conventional culture media so, *Acanthamoeba* co-culture can improve its isolation in clinical and environmental samples (La Scola *et al.*, 2001). On the other hand, some specificity between the amoeba host and some species/serogroups of *Legionella* may lead to a failure of amoebal enrichment.

Recent studies in Spain have shown the high presence of these protozoa in Central Spain (97%) (Magnet *et al.*, 2013; Magnet *et al.*, 2012), the Canary Islands (60%) (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005) and Northeast Spain (Garcia *et al.*, 2013). *Acanthamoeba per se* could act as an opportunistic parasite causing granulomatous amoebic encephalitis (GAE) in immunocompromised people. It can also infect the human cornea causing a painful amoebic keratitis (AK) that may lead to partial or complete loss of vision (Visvesvara *et al.*, 2007). This type of ocular infection is becoming more common in industrialized countries because of the use of contact lenses and poor hygiene which are the most common risk factors associated with this pathology. Outbreaks of AK associated with contact lenses have also been reported in the USA (Visvesvara *et al.*, 2007). In Spain, few cases have been described (Moreno-Montanes *et al.*, 2011). Despite GAE being a less common infection, four cases have already been reported in this country, the last one in 2012 (Blanco *et al.*, 2012).

Due to the high presence of *Acanthamoeba* in central Spain's water and the high prevalence of Legionnaires' disease in this country, the aims of this work were i) to study the presence of *Acanthamoeba* and *Legionella* in different types of water in the central area of Spain ii) their interaction and iii) the usefulness of *Legionella* culture in *Acanthamoeba* for its detection in environmental samples.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Sample collection

Water samples were collected from three Drinking Water Treatment Plants (DWTPs), three Wastewater Treatment Plants (WWTP) and five Natural Pools (NP) from the Castilian Plateau (Spain). Each sampling point was sampled two times per season studied (autumn and winter) making a total of 70 samples. For the DWTPs, up to 100 L of water were collected at the entrance (raw water) and at the exit of the plant (finished water). In the case of WWTPs, up to 50 L were collected as above and, when it was possible, a sample from tertiary water was also obtained (up to 50 L). For the NP, up to 50 L were also collected.

In the DWTP selected, the treatments followed were: preoxidation, precloration, coagulation, flocculation, decantation, sand filtration and disinfection with ozone and chloramines. For the WWTP physicochemical and biological treatments were used with activated sludge. Water samples were concentrated using IDEXX® Filta Max system as per manufacturer's instructions. A total of 7 ml were finally obtained from each concentrated sample and fractioned for different analysis (Fig. 1).

### 2.2 FLA culture

Eighty microliters of concentrated water samples were inoculated onto 2% Neff's saline non-nutrient agar plates seeded with heat shock inactivated *Escherichia coli* and incubated at 28°C. Initial cultures were monitored daily and subcultured by transferring small pieces of agar containing amoebas to a fresh plate and cloned by dilution (Magnet *et al.*, 2012).

### 2.3 FLA PCR and sequencing

**2.3.1 DNA extraction:** i) DNA extraction from concentrated water was performed from 200 µl of each water sample with Fast DNA® Kit (MP Biomedicals, Illkkrich, France) modifying the manufacturer's protocol. Shortly, to each Fastprep tube another 1/4 inch ceramic sphere was added and lysing cycles were performed in triplicate. ii) From FLA cultures, amoebae DNA was

extracted from amoebae by heat shock (99°C for 20 minutes) and was purified with NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufactures' instructions.

**2.3.2 Triplex real time PCR:** for concentrated water, a triplex real time-PCR designed to simultaneously detect *Acanthamoeba* sp, *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* was used as described elsewhere (Qvarnstrom *et al.*, 2006).

**2.3.3 *Acanthamoeba* genotyping:** from the FLA cultures identified by morphology as *Acanthamoeba*, the genotypic characterization was performed using the forward and reverse primers JDP1 and JDP2 as described previously (Schroeder *et al.*, 2001).

**2.3.4 FLA PCR:** the non *Acanthamoeba* isolates were characterized with the generic primers described by Tsvetkova *et al* (2004).

**2.3.5 Sequencing:** amplicons from *Acanthamoeba* genotyping PCR and FLA PCR were purified with NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufactures' instructions and sequenced at both ends with PCR primers through Macrogen laboratories (Korea) sequencing service. The sequences analyses were performed with Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999).

## **2.4 *Legionella* culture**

One hundred microliters of concentrated water samples were inoculated in BCYE medium (with L-cysteine, glycine, polymyxin B, anisomycin and vancomycin) agar after dilutions and treatments as described below (if not specified, samples were not diluted): i) untreated water (diluted 1/1000 for raw water from WWTP and DWTP, and for finished water from WWTP); ii) heat shock (50°C/30min) (diluted 1/10 for raw water from WWTP and DWTP, and for finished water from WWTP); iii) acid shock (HCl 0.2M-KCl 0.2M 5 min) and iv) combined heat-acid shock. Water treatments followed before culture, were based on ISO 11731:1998 guide for Water Quality.

Colonies were selected according to their morphology and passed to charcoal-yeast extract agar (BCYE) with and without L-cysteine. Colonies that required L-cysteine to grow were considered *Legionella* sp. and these were confirmed by semi-nested PCR reaction as described below.

## **2.5 Legionella culture in Acanthamoeba**

Co-culture of *Acanthamoeba* and *Legionella* protocol described by La Scola *et al* (La Scola *et al.*, 2001) was used to improve *Legionella* isolation from concentrated water samples. Shortly, in a 24 well culture plate  $3 \times 10^5$  *Acanthamoeba* trophozoites in 1.5 ml of Neff's saline per well, were infected with 100  $\mu$ l of the concentrated water and incubated at 33°C for 8 days. Amoebae and bacteria were harvested after 5 minutes ice incubation to detach the amoebae from the culture well. For this purpose, *Acanthamoeba* USP-CR5-A35 (genotype T4), a strain free of *Legionella* isolated in our laboratory (Magnet *et al.*, 2012), was used. Screening was performed by the PCR described below.

## **2.6 Legionella PCR**

**2.6.1 DNA extraction:** i) DNA extraction from water samples was performed using FastDNA kit for Soil (MP Biomedicals, Illkrich, France). ii) From *Legionella* culture, and *Acanthamoeba* co-culture, DNA was extracted from 100  $\mu$ l of diluted culture using high temperature 99°C/20 min. DNA was purified with NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany). iii) From *Acanthamoeba* isolates, DNA extraction was performed as described before.

**2.6.2 PCR and sequencing:** Semi-nested PCR described by Huang *et al* (2011) was used with some modifications. The second PCR was standardized using a real time Sybr Green PCR with the same cycling conditions and the original primers (L858 and L448). *L. pneumophila* SG 1 (NCTC 11821) was used as a reference strain to standardize the semi-nested PCR protocol. Amplicons from the first PCR were purified and sequenced as described above. The second PCR was performed with samples that resulted negative in the first PCR.

### 3. Results

#### 3.1 *Acanthamoeba* and other FLA in water samples

A total of 70 water samples were analyzed for the presence of *Acanthamoeba* (Table 1). By real time PCR, 61/70 samples tested positive and, by culture *Acanthamoeba* was identified in 60/70 samples and 56 isolates were established from 54 sampling points. If a sampling point was considered positive when it tested positive by at least one of the two techniques, then the presence of *Acanthamoeba* in the 70 samples studied was 67 out of 70 samples with either PCR or culture. It is important to highlight that the raw water of DWTP2 was positive in both winter samplings while the finished water tested negative. On the other hand, the entry of DWTP1 in the second sampling of winter was negative while the exit was positive. Other non-pathogenic FLA isolated were *ProtoAcanthamoeba bohémica* and *Naegleria gruberi* (Table 1).

From the 56 *Acanthamoeba* isolates, 36 samples were genotyped. T4 was the most common genotype (33/36), followed by T11 (2/36) and T3 (1/36) (Table 1). The DF3 region was also analyzed, for the T4 genotype, which encodes a hypervariable region following Booton *et al* (2002), Leede *et al* (2009) and Magnet *et al* (2013) nomenclature. The differences in T4/DF3 types are shown in Table 1, and new sequences are described in Fig 2.

#### 3.2 *Legionella* in water samples

Four different techniques were used to study the presence of *Legionella* in the 70 water samples (Table 2). By direct PCR of the concentrated water, 41/70 (58.6%) were positive. *L. feeleii* was identified at the entry of three of the treatment plants, at the exit of also three of them and once in the tertiary effluent. Although a high percentage was detected by PCR, only six isolates were identified by agar culture all of them corresponding to the exits of WWTP1 and WWTP3. These isolates were characterized as *L. feeleii*, *L. birminghamsiensis* and *L. gresilensis/berliardensis*.

Either by water PCR or culture, *L. feeleii* was the only species identified at the entrances and exits of the DWTPs while *L. feeleii*, *L. birminghamsiensis* and *L.*

*gresilensis/ berliardensis* were found in the WWTPs. On the other hand, no species was determined in the NPs by PCR or culture.

Additionally, in the first winter sampling at the entry of WWTP2 and at the exit of both winter samplings, the sequence obtained blasted with 100% of homology with genebank accession number DQ413067 that corresponds to an uncultured bacterium found in sludge in Korea so the species could not be identified.

When *Acanthamoeba* co-culture was used, 21 of the points that were negative by agar culture or direct PCR were found positive by this technique (Table 2) showing its usefulness in monitoring *Legionella* in water. In the first autumn sampling, a high fungus contamination allowed for the analysis of only six samples, which were all positive, three for *L. feeleii*, one for *L. fairfieldensis* and two *Legionella* sp. On the other hand, in the second autumn sampling, all samples except one were analyzed and all of them were also positive. In this sampling *L. feeleii*, *L. fairfieldensis* and *L. drozanski* were identified. In both winter samplings, only one sample was contaminated by fungus and 28/33 samples tested positive.

### **3.3 *Legionella* as an *Acanthamoeba* endosymbiont**

From the 56 *Acanthamoeba* isolates, *Legionella* was detected in 43 of them independently of the *Acanthamoeba*'s genotype. From the two T11 isolates, one was positive and one negative for *Legionella* and the T3 isolate was also positive. From the 33 *Acanthamoeba* T4, *Legionella* was found in 25 of them (75.8%). All T4 types were positive at least once for *Legionella* except T4/25, which only isolate was negative.

## **4. Discussion**

This study shows the presence of *Acanthamoeba*, *Legionella* spp. and *Acanthamoeba* infected by *Legionella* in DWTPs, WWTPs and NPs from the Castilian Plateau (Spain). Regardless of the methodology employed, the percentage of *Acanthamoeba* and *Legionella* detected in both seasons was above 90%, indicating a high frequency of these pathogens in the samples studied.

To our knowledge, few studies on the presence of *Legionella* have been carried out in DWTPs worldwide. In one of them, Kwon *et al* (2011) performed a metagenom study in a membrane filtration system from a DWTP in South Korea and found that *Legionella* was present in the particulate matter of the membrane tank. They also postulated that if, as they have seen, the membrane tank promotes the growth of pathogenic microorganisms such as *Legionella*, and the membrane surface has some defects, it would result in a potential threat to consumers. On the other hand, Garcia *et al* (2013) studied FLA and the presence of their bacterial pathogens, including *Legionella*, in water treatment plants and only found *Hartmannella* while *L. pneumophila* was found in different FLA in swamps from the same study.

In the present study, *Legionella* DNA was detected in 6/12 DWTPs finished water when analyse directly in water samples, while *Acanthamoeba* co-cultures were positive in 9/12, five of which correspond to negative samples in water PCR. On the other hand, *Acanthamoeba* presence in the finished water of these same plants was 8/12 by PCR and 10/12 by culture confirming their viability. Our results are consistent with other studies on DWTPs; in Spain, the presence of *Acanthamoeba* in drinking water has been shown to be from 60% in the Canary Islands (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005) to 97% in Madrid (Magnet *et al.*, 2013; Magnet *et al.*, 2012). In our study, it was only in DWTP2 in winter (both samplings) that *Acanthamoeba* was not detected from finished water. On the other hand, different genotypes were observed at the entry and exit in four plants supporting the hypothesis that amoeba can grow inside the plants as pointed out by Thomas *et al* (Thomas & Ashbolt, 2011). It is important to highlight that from the 11 *Acanthamoeba* isolates from finished water, seven were positive for *Legionella*, suggesting that if *Acanthamoeba* control in DWTPs can be achieved, *Legionella* and other ARB elimination will be handled more easily. Additionally, *ProtoAcanthamoeba bohemica*, a non-pathogenic amoeba, was isolated at the exit of DWTP2 and it was found negative for endo-*Legionella*.

The presence of *Acanthamoeba* and *Legionella* in WWTPs has been studied worldwide. The importance of these plants lies in their role of eliminating the pathogens from sewage effluents before returning the finished water into

the environment and its use as regenerated water. This type of water is used for watering public parks, golf courses, industrial processes and street cleaning. For all of these uses, micro-drops are formed and these can become a potential infection source for *Legionella* and other pathogens. Workers in cooling towers, ship repair facilities, professional or amateur gardeners have been described among others as risk exposed populations for Legionnaire's disease (Cameron *et al.*, 1991). Moreover, the WWTPs themselves are described as the source of Legionnaires' disease outbreaks in Finland (Kusnetsov *et al.*, 2010). Despite the presence of *Acanthamoeba* in WWTPs has also been described worldwide (Visvesvara *et al.*, 2007), there are few reports that correlate the water of these plants as a source for *Acanthamoeba* infection. In our results, a high presence of *Acanthamoeba* as well as *Legionella* is shown in both raw and finished water from WWTPs. As seen in the DWTPs, the WWTPs genotypes of *Acanthamoeba* found at the entrance and exit in two of the plants are discordant. Moreover, in the second winter sampling in WWTP1, genotype T11 and T4/2 were found at the entry and T4/13 at the exit. The tertiary treatment was only studied in one plant in autumn and was found positive for *Acanthamoeba* in one of the two samplings.

In relation to the presence of *Legionella* in WWTPs, 8/12 finished water samples were PCR positive in concentrated water and 11/12 by *Acanthamoeba* co-culture. In these plants, contrary to that of the DWTPs, *Legionella* was isolated by agar culture in finished water. Six different isolates from four points were established by agar culture. *L. feeleii* was isolated in the two winter samples from WWTP1 and, in WWTP3, once in autumn and once in winter. *L. birminghamiensis* and *L. gresilensis/berliardensis* were also isolated by culture in winter in WWTP1. Furthermore, from an *Acanthamoeba* isolated in this same plant in autumn, *L. falloni* was also detected showing the rich bacterial population that can be found in this type of water. *Legionella* was not detected in raw water by culture probably due to the nature of these samples, where an overgrowth by other bacteria was observed. In this type of water, *Legionella* was found in 16 of the 20 *Acanthamoeba* isolates (80%) and in the only *Naegleria gruberi* isolate.

Few studies on the presence of *Legionella* in natural pools have been carried out, while in man-made pools, spas and spring water, the presence of this bacterium and its relation to human diseases has been well described. Nevertheless, Huang *et al* (2011) studied the presence of this bacterium in different spring water samples in Taiwan and found higher positivity (17.9% to 29.4%) than in the spas and chlorinated swimming pools. In our study, 10/20 (50%) samples were positive for *Legionella* DNA but no growth was observed in agar culture. However, *Legionella* grew from 13 samples in co-culture with *Acanthamoeba*. In this type of water, *L. feeleii* was the most frequent species but *L. fairfieldensis* was also detected. *Acanthamoeba* was present in all the natural pools studied by PCR and grew in 18/20 samples. Genotype T4, the *Acanthamoeba* genotype most commonly associated to AK and GAE, was the only one detected in NPs. Due to the activities that take place in NPs, such as swimming, diving or splashing, contact lens wearers should be aware of not using them when bathing in this water and immunocompromised people should also avoid such activities.

In light of these results, it is important to note that despite the high presence shown for *Legionella* in all types of water, *L. pneumophila* was not found. *L. pneumophila* was the species most commonly associated with Legionnaires' disease (94.8%) (ECDC, 2011) in 2009 in Europe. The other species identified in Europe were *L. bozemanii*, *L. longbeach*, *L. maceachernii* and *L. micdadei*, none of which were identified in our study. Nevertheless, in 5% of Legionnaires' disease the species was not identified. The most common *Legionella* identified in our study was *L. feeleii*, which despite being known to produce Legionnaires' disease, cellulites and pericarditis, was not identified in the most recent European surveillance (Lee *et al.*, 2009; Loridant *et al.*, 2011). Diagnosing *L. feeleii* is not easy (Loridant *et al.*, 2011); for *Legionella* identification, a urine antigen test or latex agglutination test after culture are normally used (81.7% and 9.3% respectively) but neither of them can detect *L. feeleii*. Siegel *et al* (2010) identified *L. feeleii* by PCR and sequencing after negative testing for 31 serogroups by IFA. In the case of *L. feeleii* cellulites, the *je ne sais pas* technique was needed for its identification (Loridant *et al.*, 2011). Knowing that the presence of this *Legionella* in our environment is a fact and

that 5% of *Legionella*'s infections were not species identified, we suggest that *L. feeleii* should be added to the *Legionella* tests conducted for its identification.

Overall, the identification of *Legionella* has greatly increased in all water types when *Acanthamoeba* co-culture is used. Independently of the water type, 41/70 (58.6%) positive samples were found by direct PCR, while only 4/70 (5.7%) were found by culture and 53/70 (75.7%) by *Acanthamoeba* co-culture. Discrepancies between PCR, culture and *Acanthamoeba* co-culture results can be explained by some factors. *Legionella* growth can be inhibited or masked by overgrowth of contaminating microorganisms or it can remain as a viable organism but not in an agar cultivable state. Therefore, isolation of these microorganisms is only possible after incubation within amoebae. Also, less sensitivity showed by PCR could be due to a low concentration of *Legionella* in water under the PCR detection limit and/or to PCR inhibitors in the samples.

*Acanthamoeba* co-culture is a laborious technique and it is difficult to implement for routine diagnoses in a clinical laboratory. However, we consider that this technique would be very useful for *Legionella* detection when trying to link a Legionnaires' disease case/outbreak with the source of infection, as it is not easily done. From the EU/EEA countries where the environmental (domestic cases) follow-up was carried out, the source of infection could be established in only in 7.4% of the cases.

In respect to the presence of *Acanthamoeba* in all types of water, only two points were negative by PCR and culture but one of them was positive for *P. bohemica*, meaning that the presence of *Acanthamoeba* was 97%. In our study, the pathogenicity profile was not conducted for *Acanthamoeba*. However, all genotypes found, T3, T4 and T11 have been related to human diseases, which should make us aware of their potential as human pathogens (Booton *et al.*, 2002).

## 6. Conclusions

- Environmental *Acanthamoeba* is infected by *Legionella* to a high percentage, and due to its ubiquity, high resistance and its pathogenic potential *per se*, new methods for its elimination in treatment plants should be studied.
- The high effectivity of *Acanthamoeba* co-culture for *Legionella* detection in environmental samples has been shown.
- *L. feeleii* has been shown to be a frequent microorganism in our environment and its inclusion in Legionaries' disease diagnostic kits should be recommended.

## 7. Acknowledgements:

The authors are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance; and to Brian Crilly for his helpful revision of the manuscript. This work was funded by grant PI12/02725 from Instituto de Salud Carlos III (FISS) and FEDER and by a grant of the Fundación Universitaria San Pablo CEU. Ana Luz Galván was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias (Universidad de Antioquia, Colombia). Angela Magnet was supported by Ministerio de Educación y Ciencia-Spain (FPU grant AP2009-0415). Regina Helena Saramago Peralta and Thiago dos Santos Gomes were supported by Research Program EADS CASA-Brasil and TSG also by CAPES Foundation grant (Ministry of Education of Brazil, Brasília - DF 70040-020, Brazil).

## 8. Bibliography:

- Blanco, M. J., Catalán, G., López, J. I., Magnet, A., del Aguila, C., Pomposo, I. and Montejo, M.** (2012). Hemiparesia izquierda en paciente diabetico: encefalitis granulomatosa crónica por *Acanthamoeba*. *Revista de Neurología*.
- Booton, G. C., Kelly, D. J., Chu, Y. W., Seal, D. V., Houang, E., Lam, D. S., Byers, T. J. and Fuerst, P. A.** (2002). 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens,

contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol*, **40**, 1621-1625.

**Cameron, S., Roder, D., Walker, C. and Feldheim, J.** (1991). Epidemiological characteristics of *Legionella* infection in South Australia: implications for disease control. *Aust N Z J Med*, **21**, 65-70.

**ECDC** (2011). Legionnaires' disease in Europe 2009. *European Centre for Disease Prevention and Control*. doi: 10.2900/58495.

**Garcia, A., Goni, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M. T., Calvo-Begueria, L., Rubio, E., Fillat, M. F., Peleato, M. L. and Clavel, A.** (2013). Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environ Sci Technol*. doi: 10.1021/es400160k.

**Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95-98.

**Huang, S. W., Hsu, B. M., Huang, C. C. and Chen, J. S.** (2011). Utilization of polymerase chain reaction and selective media cultivation to identify *Legionella* in Taiwan spring water samples. *Environ Monit Assess*, **174**, 427-437. doi: 10.1007/s10661-010-1467-7.

**Kusnetsov, J., Neuvonen, L. K., Korpio, T., Uldum, S. A., Mentula, S., Putus, T., Tran Minh, N. N. and Martimo, K. P.** (2010). Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: a case report. *BMC Infect Dis*, **10**, 343.

**Kwon, S., Moon, E., Kim, T. S., Hong, S. and Park, H. D.** (2011). Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant. *Microbes Environ*, **26**, 149-155.

**La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P. J. and Raoult, D.** (2001). Isolation of *Legionella* anisa using an amoebic coculture procedure. *J Clin Microbiol*, **39**, 365-366. doi: 10.1128/JCM.39.1.365-366.2001.

- Ledee, D. R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., Fell, J., Fini, M. E. and Alfonso, E. C.** (2009). Molecular identification of t4 and t5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba keratitis* patients. *J Clin Microbiol*, **47**, 1458-1462.
- Lee, J., Caplivski, D., Wu, M. and Huprikar, S.** (2009). Pneumonia due to *Legionella feeleii*: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis*, **11**, 337-340.
- Lee, J. V. and West, A. A.** (1991). Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, **20**, 121S-129S.
- Leoni, E., Legnani, P. P., Bucci Sabattini, M. A. and Righi, F.** (2001). Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. *Water Res*, **35**, 3749-3753. doi: S0043-1354(01)00075-6 [pii].
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E. and Valladares, B.** (2005). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res*, **95**, 273-277. doi: 10.1007/s00436-005-1301-2.
- Loridant, S., Lagier, J. C. and La Scola, B.** (2011). Identification of *Legionella feeleii* cellulitis. *Emerg Infect Dis*, **17**, 145-146. doi: 10.3201/eid1701.101346.
- Magnet, A., Fenoy, S., Galván, A. L., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C. and Del Aguila, C.** (2013). A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res*, **47**, 6966-6972.
- Magnet, A., Galvan, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C., Perez-Irezabal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., da Silva, A. J. and Del Aguila, C.** (2012). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res*, **111**, 383-392. doi: 10.1007/s00436-012-2849-2.
- Modi, A., Gardner, J., Lighton, L. and Coetzee, N.** (2008). Pontiac fever outbreak associated with a spa-pool, United Kingdom, April 2008. *Euro Surveill*, **13**.

- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. and Abu Kwaik, Y.** (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 20-28.
- Moreno-Montanes, J., Barrio-Barrio, J., De-Nova, E. and Werner, L.** (2011). Lens epithelial cell death secondary to *Acanthamoeba* keratitis: absence of capsular bag opacification six years after cataract surgery. *Case Rep Ophthalmol*, **2**, 354-359. doi: 10.1159/000334785.
- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G. S., Sriram, R. and da Silva, A. J.** (2006). Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol*, **44**, 3589-3595.
- Rowbotham, T. J.** (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*, **33**, 1179-1183.
- Rumelt, S., Cohen, I., Lefler, E. and Rehany, U.** (2001). Corneal co-infection with *Scenedosporium apiospermum* and *Acanthamoeba* after sewage-contaminated ocular injury. *Cornea*, **20**, 112-116.
- Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A. and Byers, T. J.** (2001). Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*, **39**, 1903-1911. doi: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.
- Siegel, M. O., Fedorko, D. P., Drake, S. K., Calhoun, L. B. and Holland, S. M.** (2010). *Legionella feeleei* serotype 2 pneumonia in a man with chronic lymphocytic leukemia: a challenging diagnosis. *J Clin Microbiol*, **48**, 2294-2297.
- Thomas, J. M. and Ashbolt, N. J.** (2011). Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ Sci Technol*, **45**, 860-869. doi: 10.1021/es102876y.

**Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M. S. and Müller, N.** (2004). The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res*, **92**, 405-413. doi: 10.1007/s00436-003-1052-x.

**Visvesvara, G. S., Moura, H. and Schuster, F. L.** (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **50**, 1-26.

**Table 1. Presence of *Acanthamoeba* at each sampling point and its relation with endo-*Legionella*.** DWTP: Drinking Water Treatment Plant; WWTP: Wastewater Treatment Plant; RW: raw water; FW: finished water; TW: tertiary water; NP: Natural Pool; Na: culture positive but not isolated; NR: unreadable chromatogram; L: *Legionella* PCR in *Acanthamoeba* isolate. +<sup>2</sup>: 2 different isolates found; \*: culture positive for *ProtoAcanthamoeba boemica* and \*\*: *Naegleria gruberi*.

Plant	Autumn								Winter							
	PCR	1st sampling		L	PCR	2nd sampling		L	PCR	1st sampling		L	PCR	2nd sampling		L
		Culture	Genotype			Culture	Genotype			Culture	Genotype			Culture	Genotype	
DWTP 1 RW	+	-			+	+	T4/9	+	+	+	NR	+	-	-		
DWTP 1 FW	+	+	T4/12	-	+	+	T4/16	+	+	+	T4/8	+	+	+	NR	+
DWTP 2 RW	+	+ <sup>2</sup>	T4/25	-	+	+	T4/8	-	+	+	NR	-	+	+	NR	+
			T4/13	+												
DWTP 2 FW	+	+	T4/9	-	+	+	T4/8	-	-	-	*	-	-	-		
DWTP 3 RW	+	+	NR	+	+	+	T4/13	+	+	+	T4/8	-	+	+	T4/13	+
DWTP 3 FW	+	+	NR	+	+	+	T4/16	+	-	+	T4/16	+	-	+	T4/13	+
WWTP 1 RW	+	Na			+	+	T11	+	+	+	T4/12	+	-	+ <sup>2</sup>	T11	-
															T4/2	+
WWTP 1 FW	+	-			+	+	NR	+	+	+	T4/8	+	+	+	T4/13	+
WWTP 1 TW	+	+	T4/13	-	+	-										
WWTP 2 RW	+	+	NR	-	+	-			+	+	T4/8	+	+	Na	**	+
WWTP 2 FW	+	+	NR	-	+	+	T4/11	+	-	+	T4/8	+	+	+	NR	+
WWTP 3 RW	+	+	NR	+	+	+	NR	+	-	+	NR	+	+	+	T4/28	+
WWTP 3 FW	-	Na			+	+	T3	+	+	+	T4/8	+	+	-		
NP 1	+	+	T4/26	+	+	Na			+	+	T4/29	+	+	+	NR	-
NP 2	+	Na			+	+	NR	+	+	+	T4/32	+	+	+	T4/27	+
NP 3	+	-			+	+	NR	+	+	+	NR	+	+	+	T4/8	-
NP 4	+	+	T4/13	+	+	-	NR		+	+	NR	+	+	+	NR	-
NP 5	+	Na			+	+	T4/16	+	+	+	T4/8	+	+	Na		
Total	17/18 94%	15/18 67%		6/12 50%	18/18 100%	15/18 67%		12/14 86%	13/17 76%	16/17 94%		15/16 94%	13/17 76%	14/17 82%		10/14 71%

**Table 2. Presence of *Legionella* in each sampling point.** DWTP: Drinking Water Treatment Plant; WWTP: Wastewater Treatment Plant; NP: Natural Pool; RW: raw water; FW: finished water; TW: tertiary water; F: fungus contamination; NA: not applicable due to the lack of *Acanthamoeba* isolate; <sup>a</sup> *Legionella feeleii*, <sup>b</sup> *L. birminghamiensis*, <sup>c</sup> *L. gresilensis/berliardensis*, <sup>d</sup> *L. fairfieldensis*, <sup>e</sup> *L. drozanski*, <sup>f</sup> *L. falloni*, <sup>g</sup>Uncultured bacterium (found in sludge in Korea; accession number DQ413067)

Sampling	Water PCR		<i>Legionella</i> culture		<i>Legionella</i> from <i>Acanthamoeba</i> co-culture		<i>Legionella</i> from <i>Acanthamoeba</i> isolates		Water PCR	<i>Legionella</i> culture		<i>Legionella</i> from <i>Acanthamoeba</i> co-culture		<i>Legionella</i> from <i>Acanthamoeba</i> isolates		
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	
DWTP 1 RW	+	+ <sup>a</sup>	-	-	F	+ <sup>a</sup>	NA	+	+	+	-	-	+	+	+	NA
DWTP 1 FW	-	+	-	-	F	+ <sup>a</sup>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
DWTP 2 RW	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
DWTP 2 FW	-	-	-	-	+	+ <sup>a</sup>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	NA
DWTP 3 RW	+ <sup>a</sup>	-	-	-	+ <sup>a</sup>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
DWTP 3 FW	+ <sup>a</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
WWTP 1 RW	+	+ <sup>a</sup>	-	-	F	+ <sup>a, e</sup>	NA	+	+	-	-	-	F	+	+	+
WWTP 1 FW	-	+ <sup>a</sup>	-	-	F	+ <sup>a</sup>	NA	+ <sup>f</sup>	+	+	+ <sup>a, b</sup>	+ <sup>a, c</sup>	+	+	+	+
WWTP 1 TW	-	+ <sup>a</sup>	-	-	F	+ <sup>a</sup>	-	NA								
WWTP 2 RW	+	-	-	-	+	+	-	NA	+ <sup>g</sup>	+	-	-	+	+	+	+
WWTP 2 FW	+	-	-	-	+ <sup>d</sup>	+	-	+	+ <sup>g</sup>	+ <sup>g</sup>	-	-	+	+	+	+
WWTP 3 RW	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
WWTP 3 FW	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>a</sup>	+	NA	+	-	+	-	+ <sup>a</sup>	+	+	+	NA
NP 1	+	+	-	-	F	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	NA	+	-	-	-	+	+	+	-
NP 2	-	+	-	-	F	+ <sup>d</sup>	NA	+	-	+	-	-	+	+	+	NR
NP 3	-	+	-	-	F	+ <sup>a</sup>	NA	+	-	+	-	-	+	+	+	NR
NP 4	-	+	-	-	F	+ <sup>a</sup>	+	NA	-	+	-	-	+	-	+	-
NP 5	-	-	-	-	F	F	NA	+	-	+	-	-	+	+	+	NR
Total	9/18	9/18	1/18	0/18	8/8	17/17			10/17	13/17	1/17	2/17	14/16	14/17		
	50%	50%	6%	0%	100%	100%			59%	76%	6%	12%	88%	82%		

**AUTUMN**

**WINTER**

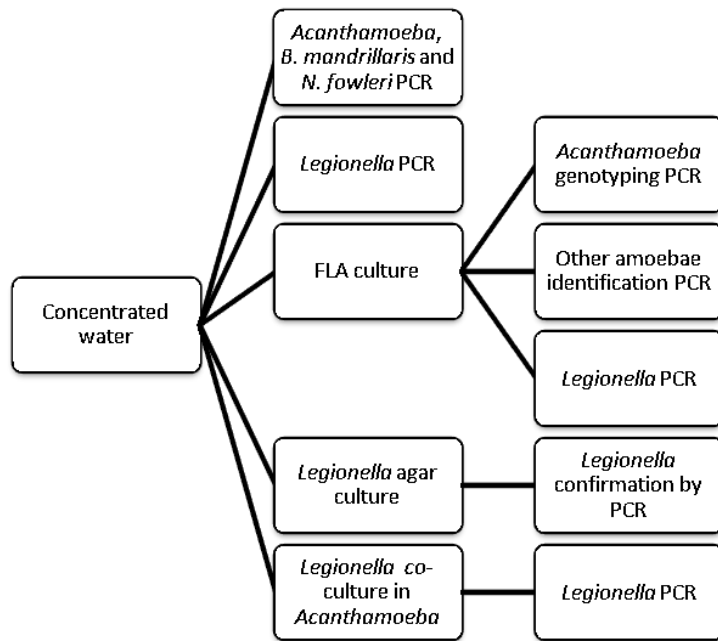


Fig. 1: Workflow scheme followed for *Acanthamoeba* and *Legionella* analysis from concentrated water.

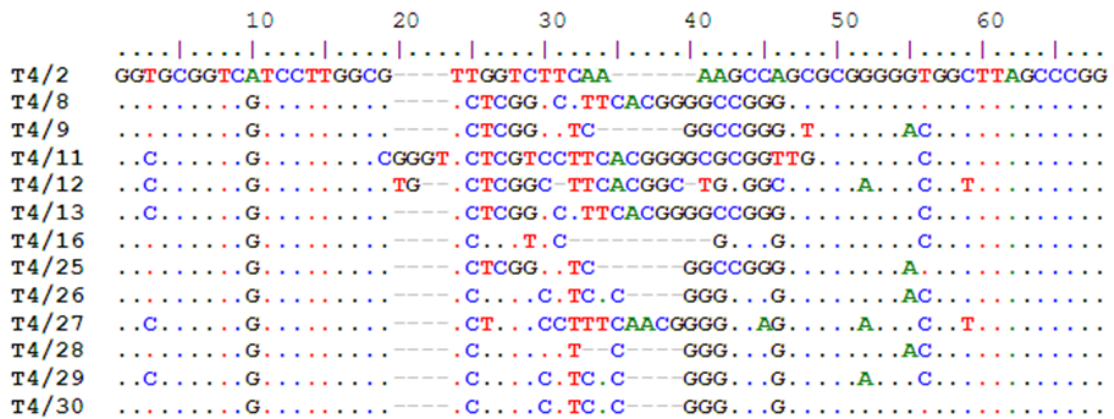


Fig. 2: Primary sequence alignment of a subset area of the DF3 that contains the highly variable and informative section of this fragment of the studied isolates. Asterisks denote variable positions; gaps are represented by dashes.



### **3.4 ESTUDIO 4: NOVEL ACANTHAMOEBA 18S RRNA GENE SEQUENCE TYPE FROM AN ENVIRONMENTAL ISOLATE.**

Magnet, A<sup>a</sup>; Henriques-Gil, N<sup>b</sup>; Galván, AL<sup>a,c</sup>; Izquierdo, F<sup>a</sup>; Fenoy, S<sup>a</sup>; del Aguila, C<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain; <sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain; <sup>c</sup> Escuela de Microbiología, Grupo Parasitología. Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia

**Publicado en:** Parasitology Research

**doi:** 10.1007/s00436-014-3945-2

**Índice de impacto:** 2.852

**Categoría JCR:** "Parasitology"

**Posición dentro de su categoría:** 1er tercil



## Resumen

### **“Descripción de un nuevo genotipo basado en el gen de la subunidad 18S de RNA de *Acanthamoeba* procedente de un aislado ambiental”.**

*Acanthamoeba* es una ameba anfizoica de vida libre que puede parasitar a un gran número de vertebrados y que, cada vez más, supone una amenaza para la salud humana debido a la resistencia de su forma quística a condiciones ambientales desfavorables, desinfectantes y diferentes tratamientos del agua así como a su distribución cosmopolita.

La clasificación tradicional dentro del género *Acanthamoeba* se basa únicamente en la morfología del quiste aunque, en la actualidad está siendo relegada y sustituida por la clasificación atendiendo al tipo de genotipo según la secuencia del gen de la subunidad pequeña 18S del ARN ribosomal (ARNr), debido a que, dependiendo del medio de cultivo en el que crezcan las amebas, estas pueden adquirir características morfológicas que las definirían como especies distintas. Por otro lado la clasificación binominal heredada de la caracterización morfológica también está en desuso ya que una especie identificada por su morfología podría corresponderse con más de un genotipo y viceversa.

En la actualidad hay descritos 18 genotipos nombrados como T1-T18. Estos genotipos proceden tanto de muestras ambientales como de aislados de muestras de individuos infectados. Aquellos genotipos aislados de muestras clínicas se describen como potencialmente patógenos y son T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12, T15 y T18.

En el presente trabajo se describe un nuevo aislado de *Acanthamoeba* de una Estación Depuradora de Agua Residual como un nuevo genotipo, T19.



# Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate

A. Magnet · N. Henriques-Gil · A. L. Galván-Díaz ·  
F. Izquierdo · S. Fenoy · C. del Aguila

Received: 21 February 2014 / Accepted: 5 May 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** The free-living amoebae, *Acanthamoeba*, can act as opportunistic parasites on a wide range of vertebrates and are becoming a serious threat to human health due to the resistance of their cysts to harsh environmental conditions, disinfectants, some water treatment practices, and their ubiquitous distribution. Subgenus classification based on morphology is being replaced by a classification based on the sequences of the 18S rRNA gene with a total of 18 different genotypes (T1–T18). A new environmental strain of *Acanthamoeba* isolated from a waste water treatment plant is presented in this study as a candidate for the description of the novel genotype T19 after phylogenetic analysis.

**Keywords** *Acanthamoeba* · Novel genotype · T19 · 18S rRNA gene · 18S rDNA

## Introduction

*Acanthamoeba* genus comprises more than 21 species of free-living amoeba widely distributed in very different habitats such as fresh and salt waters, drinking water, contact lenses,

washing solutions, ventilation systems, dialysis apparatus, hydrotherapy areas in hospitals, and dental irrigation systems among others (Booton et al. 2005; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Visvesvara et al. 2007). *Acanthamoeba* is one of the free-living amoebae that can act as an opportunistic parasite in humans causing the infection of the central nervous system (CNS) named granulomatous amoebic encephalitis (GAE) as well as lung, skin, and cornea infections which, in the case of the latter, may lead to partial or complete loss of vision called *Acanthamoeba* keratitis (AK) (Visvesvara et al. 2007).

Traditionally, species identification beyond this genus has been based on morphological characteristics of the cyst described by Pussard and Pons (1977). However, this classification has been shown to be inconsistent because correlation between binomial classification and molecular typing is, in most cases, not concordant. One morphological identified species can correspond to more than one genotype and vice versa. Moreover, biochemical, growth or pathogenic characteristics, and distribution have also highlighted these incoherencies in strain/species clustering (Gast et al. 1996; Khan and Tareen 2003). A first attempt at a more objective classification was based on isoenzyme classification (Costas and Griffiths 1984) but failed to make the situation clearer. For these reasons, Gast et al. (1996) proposed a classification of *Acanthamoeba* based on the 18S ribosomal RNA full gene sequence and found four different genotypes named T1 to T4, establishing a 6 % dissimilarity value as the parameter used to define a new genotype. Later, Stothard et al. (1998) proposed to decrease the value to 5 % and, more recently, Corsaro and Venditti (2010) suggested a less strict application of this 5 % dissimilarity value. Following this classification, 14 new genotypes have been described (Corsaro and Venditti 2010; Hewett et al. 2003; Horn et al. 1999; Nuprasert et al. 2010; Qvarnstrom et al. 2013; Stothard et al. 1998).

*Acanthamoeba* 18S ribosomal RNA (rRNA) gene has 12 variable regions distributed as described by Gast et al. (1996).

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00436-014-3945-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Magnet · A. L. Galván-Díaz · F. Izquierdo · S. Fenoy ·  
C. del Aguila (✉)  
Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain  
e-mail: cagupue@ceu.es

A. Magnet · N. Henriques-Gil · F. Izquierdo · S. Fenoy ·  
C. del Aguila  
Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain

A. L. Galván-Díaz  
Escuela de Microbiología, Grupo Parasitología, Universidad de  
Antioquía, Medellín, Colombia

According to Corsaro and Venditti (2011), all of them should be considered in order to describe any new genotype. Nevertheless, T15 genotype is generally accepted despite only being established by the GTSA. B1 fragment that comprises 8 of the 12 variable regions (about 1,500 bp). In the case of the T16 genotype, two descriptions have been published, one based on the Ami fragment that includes 5 of the 12 variable regions (850 bp approximately) (Łanocha et al. 2009) and one on the full length sequence (Corsaro and Venditti 2010). Because the genotype classification was originally performed on the whole sequence, for our study, we used the T16 genotype described by Corsaro and Venditti (2010) as a reference for genotype assignment.

The *Acanthamoeba* genotypes do not necessarily correlate to the 21 species established by morphology but allow appreciation of how diverse this genus is and can explain its worldwide distribution and its ability to colonize very different environments. Booton et al. (2005) studied the distribution of *Acanthamoeba* genotypes in environmental and clinical samples, showing T4 to be the most common genotype either in the environment or as the causative agent of different diseases. T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12, T15, and T18 were also described as pathogenic (Booton et al. 2005; Qvarnstrom et al. 2013; Stothard et al. 1998; Walochnik et al. 2008). A more recent revision on *Acanthamoeba* genotype distribution (Maciver et al. 2013) has corroborated T4 as the most abundant genotype in human environments, and it is significantly more likely to be associated with human disease, followed by T3 and T11 which are both phylogenetically close to T4. T5 was shown to be the most common one in freshwater. The other genotypes have occasionally been isolated in low frequencies with the exception of T11 (Maciver et al. 2013).

The current study describes the morphological and phylogenetic characteristics of an *Acanthamoeba* strain isolated from a waste water treatment plant from Spain and proposes it as a novel genotype named T19.

## Material and methods

**Sample origin and culture** Amoebae were isolated from a water sample collected from the entrance of a wastewater treatment plant (WWTP) from central Spain, following the protocol of Magnet et al. (2012). Shortly, water was concentrated by using IDEXX® Filta Max system, and 80 µl of the concentrated water was inoculated onto a non-nutrient agar plate seeded with heat inactivated *Escherichia coli*. When amoebae were observed under the microscope, agar pieces were subcultured in a new agar plate until the amoebae were free from other microorganism contamination. To establish pure strains, single agar fragments were transferred into

axenic cultures by placing them in PYG medium (0.75 % proteose peptone, 0.75 % yeast extract, and 1.5 % glucose with 40 µg/ml gentamicin) at 28 °C without shaking.

**Morphological classification** Fifty cysts were measured using Nikon Digital-sight DS-L2 controller. The new strain was classified following the Pussard and Pons (1977) system.

**Thermotolerance and osmotolerance test** To study the potential pathogenicity of the new strain, thermotolerance and osmotolerance were studied following the protocol of Khan et al. (2001) with some differences. Shortly, for the thermotolerance test, 10<sup>3</sup> trophozoites were added to a non-nutrient agar plate seeded with inactivated *E. coli* and incubated at 28, 33, 37, and 42 °C by triplicate. Growth was measured after 72 h. For the osmotolerance test, the new strain was inoculated onto non-nutrient agar plates with 1 M mannitol and seeded with inactivated *E. coli* and incubated at 33 °C. The optimal growth temperature of 33 °C was selected after the thermotolerance test.

**DNA extraction and sequencing** Amoebae trophozoites were harvested from cultured flasks centrifuged at 1,000 rpm for 10 min and washed two times with PBS prior to DNA extraction. DNA was extracted using DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions for cultured cells. To obtain the whole 18S rRNA gene sequence, a fragment of approximately 1,650 bp was amplified with primers FLA-F and SSUB, and a fragment of approximately 1,100 bp was amplified with primers CRN5 and 892 which overlaps with the first fragment for 480 bp approximately. The primers used for sequencing are shown in Table 1. PCR products were purified according to the manufacturer's instructions by using the NucleoSpin® Extract II kit (MACHEREY-NAGEL, Germany). Capillary sequencing was carried out by the sequencing service of MACROGEN (Korea). The resulting sequences were edited and aligned with the Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall 1999) and deposited in GeneBank.

**Phylogenetic analyses** The sequence obtained was aligned with representatives of each *Acanthamoeba* genotype shown in the supplementary data. Alignment was performed and edited with BioEdit program (Hall 1999), and introns were removed for the analyses. Two different analyses were carried out in order to include the T15 genotype, one of the whole 18S sequence (excluding T15) and one with a partial sequence of approximately 1,500 bp to include T15 in the analysis. Genetic dissimilarity was calculated as a percentage of mismatched bases in pairwise comparisons under global optimal alignment of sequences without the removal of unique gaps or ambiguous positions between sequences.

**Table 1** Primers used for sequencing the whole 18S rRNA gene. Location of the primers is in relation with *Acanthamoeba castellanii*, Neff ATCC 50373 (Genebank accession# U07416)

Primer	Sense	Location	Sequence	Reference
CRN5	FW	1–20	CTGGTTGATCCTGCCAGTAG	Schroeder et al. (2001)
373	RV	472–452	TCAGGCTCCCTCTCCGGAATC	Schroeder et al. (2001)
FLA-F	FW	650–673	CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC	Tsvetkova et al. (2004)
JDP1	FW	933–954	GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA	Schroeder et al. (2001)
892	RV	1,137–1,118	CCAAGAATTTACCTCTGAC	Schroeder et al. (2001)
JDP2	RV	1,399–1,376	TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA	Schroeder et al. (2001)
1262C	FW	1,582–1,601	GTGGTGCATGCCGTTCTTA	Weekers et al. (1994)
FLA-R	RV	1,655–1,632	CAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTAAC	Tsvetkova et al. (2004)
SSU2B	RV	2,274–2,295	GATCCTTCTGCAGGTTACCTA	Weekers et al. (1994)

For the phylogenetic analysis, three treeing methods were constructed with MEGA5 (Tamura et al. 2011): (a) neighbor-joining (NJ) (gap/missing data treatment: pairwise deletion, Kimura 2-parameter substitution model), (b) maximum parsimony (MP) with subtree-pruning-regrafting (SPR) (gap/missing data treatment: partial deletion, with 10 initial trees and a maximum of 100), and (c) maximum likelihood (ML) (gap/missing data treatment: partial deletion, Kimura 2-parameter model for substitution with very strong branch swap filter). In all cases, a bootstrap of 1,000 replications was performed.

## Results

**Morphology classification, thermotolerance and osmotolerance tests** The new strain isolated in axenic medium presented the trophozoite's characteristic acanthopodia, mononucleated, and a high number of vacuoles in the cytoplasm (Fig. 1). Cysts presented a double wall with a rounded endocyst and a thin ectocyst with a mean cyst diameter of  $11.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ . The new strain was named as USP-AWW-A68 and classified as group III following Pussard and Pons (1977) classification. In the thermotolerance test, *Acanthamoeba*

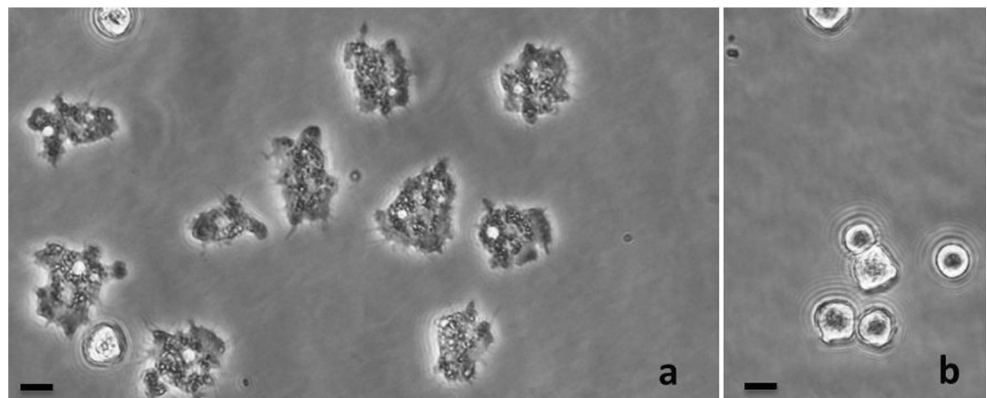
growth was only observed at 28 and 33 °C. The radial distance from the seeding point at 28 °C was  $2.9 \pm 0.2 \text{ cm}$  and at 33 °C was  $5.2 \pm 0.2 \text{ cm}$ , whilst in the osmotolerance test, no growth was observed after 72 h.

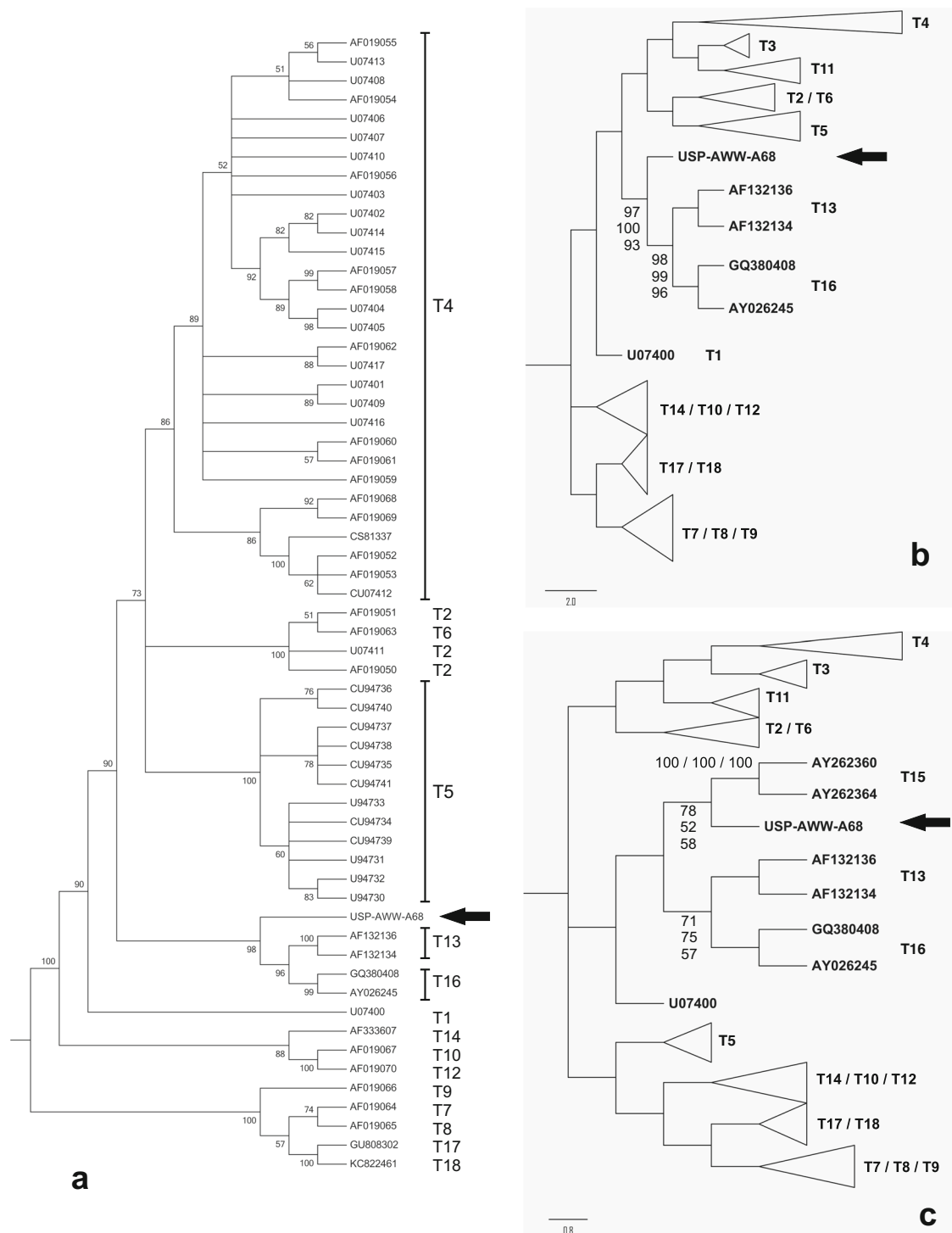
**Phylogenetic analyses** *Acanthamoeba* USP-AWW-A68 dissimilarities with the other genotypes vary from 7.7 % with T16 to 33 % with T7. In the full length 18S analysis independently of the phylogenetic treeing method used, USP-AWW-A68 emerges as an independent branch in the same cluster as T13 and T16 (Fig. 2). When T15 was also included, dissimilarities were even higher and varied from 8.6 % with T16 to 40.3 % with T9. As in the longer fragment, USP-AWW-A68 emerges as an independent branch in the phylogenetic tree no matter which model is used. New sequence was deposited at GenBank with accession number KJ413084.

## Discussion

Following the criterion of Stothard et al. (1998) of 5 % dissimilarity, *Acanthamoeba* USP-AWW-A68 should be included as a new genotype named as *Acanthamoeba* T19 because

**Fig. 1** Morphological characteristics of USP-AWW-A68. **a** Trophozoite with the characteristic acanthopodia, mononucleated nucleus, and a high number of vacuoles in the cytoplasm; two cysts also appeared in **a**. **b** Cysts presenting a double wall with a rounded endocyst and a thin ectocyst with a mean cyst diameter of  $11.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ . Size bar =  $10 \mu\text{m}$





**Fig. 2** Phylogenetic trees for the rDNA genotypes of *Acanthamoeba*; the new genotype described here for USP-AWW-A68 isolate is *arrowed*. **a** ML tree for all the genotypes reported except T15. Each genotype (T1 to T18) is given with its correspondent GenBank accession number; posteriori probabilities greater than 60 % are indicated in the respective

its dissimilarity with the other genotypes varies from 7.7 % with T16 to 33 % with T7. When T15 was also included and a shorter fragment studied, dissimilarities were even higher and varied from 8.6 % with T16 to 40.3 % with T9.

nodes. **b** Detailed position of USP-AWW-A68 isolate in respect to its closest genotypes; NJ, ML, and MP methods of inference produce similar trees, and the respective bootstrap probabilities are given in the nodes. **c** The inclusion of the genotype T15, which is based on a shorter nucleotide sequence, maintains the same genotype segregation

When phylogenetic relationships of this new genotype are studied, it is seen to share a common node with T13, T15, and T16, which are also environmental genotypes. Despite the fact that T13 has also been isolated from nasal swabs and contact

lenses, it is considered an environmental isolate (Booton et al. 2005). In the partial phylogenetic trees, *Acanthamoeba* USP-AWW-A68 emerges as a sister group of T15. At present, it is difficult to definitely elucidate the clustering of both genotypes. Indeed, only a partial 18S rDNA sequence of T15 is available, which only allows eight variable regions of T15 and T19 to be compared. However, since a dissimilarity of approximately 18 % is achieved, which is very different from the 5 % criterion of Stothard et al. (1998), it can be assumed that if the whole 18S rDNA sequence is used, T15 and T19 will still branch as different genotypes.

The thermotolerance and osmotolerance tests carried out on the *Acanthamoeba* USP-AWW-A68 strain indicated that this strain is probably a non-pathogenic strain. Other tests in addition to thermotolerance and osmotolerance such as cytopathic effect on cell culture (Corsaro and Venditti 2010; Nagyova et al. 2010) have been proposed to determine environmental *Acanthamoeba* pathogenicity, but there is still no consensus as to the gold standard technique for determination of pathogenicity. Thermotolerance or osmotolerance tests can give an indication of the potential pathogenicity of the isolates; however, for AK, it is known that the capacities to grow at high temperatures and/or high osmolality are not as critical as they are for central nervous system infections because the corneal surface temperature is slightly lower than normal mammalian body temperature (Schuster and Visvesvara 2004). In vivo models shown to be good tests of pathogenicity have been developed in mice (De Jonckheere 1980) and locusts (Mortazavi et al. 2009), but considering that this strain of T19 is not osmotolerant nor thermotolerant, its lack of pathogenicity can thus be assumed without performing in vivo tests.

Nineteen genotypes for *Acanthamoeba* have so far been described; only 17 years after Gast et al. (1996) established the systematic *Acanthamoeba* classification and due to its worldwide distribution, it should not be surprising if more genotypes are described in the near future. Due to the possible pathogenic characteristics of *Acanthamoeba* as well as its role as a carrier of other microorganisms, the classification of these protozoa has been proved as an indispensable component for a complete and better understanding of this complex organism. *Acanthamoeba* genotyping has been shown to be a good tool for its classification because despite the 18S rDNA being highly conserved in nature in this protozoon, it has sufficient variability to differentiate between strains.

## Conclusion

The environmental strain *Acanthamoeba* USP-AWW-A68 belonging to morphological group III is presented as a new genotype, T19, based on the genetic and phylogenetic data of the 18S rDNA.

**Acknowledgments** The authors are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance and to Brian Crilly for his helpful revision of the manuscript. This work was funded by grant PI12/02725 from Instituto de Salud Carlos III (FISS) and FEDER and by grant USPCEU-PC07-2013 of the Fundación Universitaria San Pablo CEU. Ana Luz Galván was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias (Universidad de Antioquia, Colombia). Angela Magnet was supported by Ministerio de Educación y Ciencia-Spain (FPU grant AP2009-0415).

## References

- Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA (2005) Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* 43(4): 1689–1693. doi:10.1128/JCM.43.4.1689-1693.2005
- Corsaro D, Venditti D (2010) Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res* 107(1):233–238. doi:10.1007/s00436-010-1870-6
- Corsaro D, Venditti D (2011) More *Acanthamoeba* genotypes: limits to the use of rDNA fragments to describe new genotypes. *Acta Protozool* 50:49–54
- Costas M, Griffiths AJ (1984) The esterases and acid-phosphatases of *Acanthamoeba* (Amoebida, Acanthamoebidae). *Proc Natl Acad Sci USA* 20:33–41
- De Jonckheere JF (1980) Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 39(4):681–685
- Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ (1996) Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 43(6):498–504
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP (2003) Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool* 42:325–329
- Horn M, Fritsche TR, Gautom RK, Schleifer KH, Wagner M (1999) Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol* 1(4):357–367
- Khan NA, Tareen NK (2003) Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol (Praha)* 50(2):97–104
- Khan NA, Jarroll EL, Paget TA (2001) *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr Microbiol* 43(3):204–208. doi:10.1007/s002840010288
- Łanocha N, Kosik-Bogacka D, Maciejewska A, Sawczuk M, Wilk A, Kuźna-Grygiel W (2009) The occurrence *Acanthamoeba* (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland. *Acta Protozool* 48(3):271–279
- Maciver SK, Asif M, Simmen MW, Lorenzo-Morales J (2013) A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *Eur J Protistol* 49(2):217–221. doi:10.1016/j.ejop.2012.11.004
- Magnet A, Galvan AL, Fenoy S, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, Perez-Irezabal J, Bandyopadhyay K, Visvesvara GS, da Silva AJ, Del Aguila C (2012) Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res* 111:383–392. doi:10.1007/s00436-012-2849-2

- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16(2):273–307
- Mortazavi PN, Goldsworthy G, Kirk R, Khan NA (2009) Novel model for the in vivo study of central nervous system infection due to *Acanthamoeba* spp. (T4 genotype). *J Med Microbiol* 58(Pt 4):503–508. doi:10.1099/jmm.0.005462-0
- Nagyova V, Nagy A, Timko J (2010) Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. *Parasitol Res* 106(4):861–872
- Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S (2010) Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol* 48(12):4636–4640. doi:10.1128/JCM.01090-10
- Pussard M, Pons R (1977) Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Proc Natl Acad Sci USA* 13:557–610
- Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS (2013) Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol* 60(6):626–633. doi:10.1111/jeu.12069
- Schroeder JM et al (2001) Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 39(5):1903–1911. doi:10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001
- Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34(9):1001–1027
- Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ (1998) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 45(1):45–54
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731–2739
- Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N (2004) The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* 92(5):405–413. doi:10.1007/s00436-003-1052-x
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(1):1–26. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x
- Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, Steuer A, Visvesvara G, Vetter N, Aspöck H (2008) Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol* 46(1):338–340
- Weekers PH, Gast RJ, Fuerst PA, Byers TJ (1994) Sequence variations in small-subunit ribosomal RNAs of *Hartmannella vermiformis* and their phylogenetic implications. *Mol Biol Evol* 11(4):684–690

**Supplementary data.** *Acanthamoeba* strains used in the description of its genotypes \*Introns removed for analysis

Seq. type	Species classification	Strain name	GeneBank Acc. #	Ref
T1	<i>A. castellanii</i>	CDC:0981:V006	U07400	(Gast et al. 1996)
T2	<i>A. palestinensis</i>	Reich (ATCC 30870)	U07411	(Gast et al. 1996)
T2	<i>A. pustulosa</i>	GE3a (ATCC 50252)	AF019050	(Stothard et al. 1998)
T2	<i>A. polyphaga</i>	OX-1; CCAP:1501/3c	AF019051	(Stothard et al. 1998)
T3	<i>A. pearcei</i>	ATCC 50435	AF019053	(Stothard et al. 1998)
T3	<i>A. griffini</i>	S-7 (ATCC 30731)	*U07412	(Gast et al. 1994; Gast et al. 1996)
T3	<i>A. polyphaga</i>	Panola Mountain (ATCC 30487)	AF019052	(Stothard et al. 1998)
T3	<i>A. griffini</i>	TIO:H37	*S81337	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. species</i>	Jin-E5 (ATCC 50710)	AF019054	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. species</i>	Liu-E1 (ATCC 50709)	AF019055	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. polyphaga</i>	HC-2	AF019056	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. culbertsoni</i>	Diamond	AF019057	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. species</i>	Vazaldua (CEI:M95:5:27)	AF019058	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. species</i>	CEI:M95:7:45 (ATCC 50711)	AF019059	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. hatchetti</i>	2AX1 (ATCC 30731)	AF019060	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. polyphaga</i>	Page-23 (ATCC 30871)	AF019061	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. polyphaga</i>	Nagington (ATCC 30873)	AF019062	(Stothard et al. 1998)
T4	<i>A. castellanii</i>	CDC:0184:V014 (ATCC 50492)	U07401	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. polyphaga</i>	CDC:0884:V029	U07402	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. castellanii</i>	CDC:0786:V042 (ATCC 50493)	U07403	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. species</i>	CDC:0688:V125 (ATCC 50498)	U07404	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. castellanii</i>	CDC:0180:1	U07405	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. rhyodes</i>	BCM:0685:116 (ATCC 50368)	U07406	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. polyphaga</i>	BCM:0173:16 (ATCC 50371)	U07407	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. species</i>	BCM:1282:324 (ATCC 50496)	U07408	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. species</i>	BCM:0288:27 (ATCC 50369)	U07409	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. species</i>	BCM:0288:37 (ATCC 50497)	U07410	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. castellanii</i>	Castellani (ATCC 50374)	U07413	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. castellanii</i>	Ma (ATCC 50370)	U07414	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. polyphaga</i>	JAC/S2 (ATCC 50372)	U07415	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. castellanii</i>	Neff (ATCC 50373)	U07416	(Gast et al. 1996)
T4	<i>A. royreba</i>	Oak Ridge (ATCC 30884)	U07417	(Gast et al. 1996)
T5	<i>A. lenticulata</i>	45 (ATCC50703)	U94730	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)

T5	<i>A. lenticulata</i>	7327 (ATCC50705)	U94731	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	72/2 (ATCC50704)	U94732	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	68-2 (ATCC50427)	U94733	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	407-3a (ATCC50692)	*U94734	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	E18-2 (ATCC50690)	*U94735	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	118 (ATCC50706)	*U94736	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	53-2 (ATCC50641)	*U94737	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	NJSP-3-2 (ATCC50429)	*U94738	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	Jc-1 (ATCC50428)	*U94739	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	25/1 (ATCC50707)	*U94740	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T5	<i>A. lenticulata</i>	PD2S (ATCC30841)	*U94741	(Schroeder-Diedrich et al. 1998; Stothard et al. 1998)
T6	<i>A. palestinensis</i>	2802 (ATCC 50708)	AF019063	(Stothard et al. 1998)
T7	<i>A. astronyxis</i>	Ray & Hayes (ATCC 30137)	AF019064	(Stothard et al. 1998)
T8	<i>A. tubiashi</i>	OC-15C (ATCC 30867)	AF019065	(Stothard et al. 1998)
T9	<i>A. comandoni</i>	Comandon & de Fonbrune (ATCC 30135)	AF019066	(Stothard et al. 1998)
T10	<i>A. culbertsoni</i>	Lilly A-1 (ATCC 30171)	AF019067	(Stothard et al. 1998)
T11	<i>A. hatchetti</i>	BH-2	AF019068	(Stothard et al. 1998)
T11	<i>A. stevensoni</i>	RB:F:1 (ATCC 50388)	AF019069	(Stothard et al. 1998)
T12	<i>A. healyi</i>	CDC 1283:V013	AF019070	(Stothard et al. 1998)
T13	<i>A. species</i>	UWC9	AF132134	(Horn et al. 1999)
T13	<i>A. species</i>	UWET39	AF132136	(Horn et al. 1999)
T14	<i>A. species</i>	PN15	AF333607	(Gast 2001)
T15	<i>A. jacobsi</i>	ATCC 30732	AY262360	(Hewett et al. 2003)
T15	<i>A. jacobsi</i>	AC080	AY262361	(Hewett et al. 2003)

T15	<i>A. jacobsi</i>	AC194	AY262362	(Hewett et al. 2003)
T15	<i>A. jacobsi</i>	AC227	AY262363	(Hewett et al. 2003)
T15	<i>A. jacobsi</i>	AC304	AY262364	(Hewett et al. 2003)
T15	<i>A. jacobsi</i>	AC305	AY262365	(Hewett et al. 2003)
T16	<i>A. species</i>	cvX	GQ380408	(Corsaro and Venditti 2010)
T16	<i>A. species</i>	U/H-C1	AY026245	(Corsaro and Venditti 2010)
T17	<i>A. species</i>	Ac_E9b	GU808302	(Nuprasert et al. 2010)
T18	<i>A. byersi</i>	CDC:V621	KC822461	(Qvarnstrom et al. 2013)

- Corsaro D, Venditti D (2010) Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res* 107(1):233-8 doi:10.1007/s00436-010-1870-6
- Gast RJ (2001) Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol* 48(6):609-15
- Gast RJ, Fuerst PA, Byers TJ (1994) Discovery of group I introns in the nuclear small subunit ribosomal RNA genes of *Acanthamoeba*. *Nucleic Acids Res* 22(4):592-6
- Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ (1996) Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 43(6):498-504
- Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP (2003) Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica* 42:325-329
- Horn M, Fritsche TR, Gautom RK, Schleifer KH, Wagner M (1999) Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol* 1(4):357-67 doi:emi45 [pii]
- Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S (2010) Identification of a novel t17 genotype of *acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol* 48(12):4636-40 doi:JCM.01090-10 [pii] 10.1128/JCM.01090-10
- Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS (2013) Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *The Journal of eukaryotic microbiology* 60(6):626-33 doi:10.1111/jeu.12069
- Schroeder-Diedrich JM, Fuerst PA, Byers TJ (1998) Group-I introns with unusual sequences occur at three sites in nuclear 18S rRNA genes of *Acanthamoeba lenticulata*. *Curr Genet* 34(1):71-8
- Stothard DR, et al. (1998) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 45(1):45-54



### **3.5 ESTUDIO 5: HEMIPARESIA IZQUIERDA EN UN PACIENTE DIABÉTICO: ENCEFALITIS GRANULOMATOSA CRÓNICA POR *ACANTHAMOEBA***

María José Blanco-Vidal <sup>a</sup>, Gregorio Catalán-Urribarrena <sup>b</sup>, José Ignacio López <sup>c</sup>, Carmen del Águila <sup>d</sup>, Ángela Magnet <sup>d</sup>, Iñigo Pomposo-Gaztelu <sup>b</sup>, Miguel Montejo <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Enfermedades Infecciosas. <sup>b</sup> Servicio de Neurocirugía. <sup>c</sup> Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Cruces. Barakaldo, Vizcaya. <sup>d</sup> Universidad San Pablo-CEU. Boadilla del Monte, Madrid, España.

**Publicado en:** Revista de Neurología 2013 Feb 1; 56(3):187-8.

**Índice de impacto:**

**Categoría JCR:** " "

**Posición dentro de su categoría:** 3er tercil

---

## 4. DISCUSIÓN.



#### 4.1 DISTRIBUCIÓN DE *ACANTHAMOEBA* Y OTRAS AMEBAS DE VIDA LIBRE EN MUESTRAS AMBIENTALES EN ESPAÑA

En el presente trabajo se muestran los primeros datos sobre la presencia de *Acanthamoeba*, *B.mandrillaris* y *N. fowleri* en aguas de diferentes ETAPs, EDARs, aguas superficiales y aguas recreacionales de la zona centro de España. El seguimiento de dichos protozoos se realizó durante un año (2008-2009) para estudiar su posible estacionalidad y se continuó durante el otoño e invierno de 2011. En ambos periodos de tiempo se determinó la presencia de dichas AVL tanto a la entrada como a la salida de las plantas de depuración y potabilización para evaluar la efectividad de los tratamientos seguidos en las mismas.

Los resultados obtenidos en el estudio anual revelaron que la presencia de *Acanthamoeba* es constante a lo largo del año sin presentar cambios notorios en ninguna de las estaciones lo que se opone a otro estudio anual realizado en Tulsa (EEUU) (John y Howard, 1995). En el trabajo americano se estudiaron diferentes charcas y estanques y se observó por el contrario, que la presencia de *Acanthamoeba* era mayor en primavera y comienzos del verano. Las diferencias observadas entre ambos trabajos podrían estar relacionadas con las características climatológicas de las zonas de estudio. Tulsa pertenece a una región con clima subtropical mientras que la zona centro de España se engloba en el clima Mediterráneo-continental. Debido a que las temperaturas anuales son similares para ambos climas el factor más importante para la estacionalidad de *Acanthamoeba* podría deberse a las perturbaciones climatológicas. En Madrid, éstas se dan ocasionalmente incluso en la época de lluvias, mientras que Tulsa está localizada en la región conocida como el "Tornado Alley"<sup>8</sup> donde las tormentas con granizo y fuertes vientos son comunes en verano. El descenso en la presencia de *Acanthamoeba* observado por John y Howard (1995) corresponde con el inicio de la temporada de tormentas. Por otro lado, la presencia constante de *Acanthamoeba* a lo largo del año en la zona centro de España podría estar justificada también por la elevada resistencia de este protozoo a diferentes temperaturas pues ha sido aislado de agua con temperaturas entre 6°C y 42°C (John y

---

<sup>8</sup> "Tornado Alley" es un término coloquial usado en los Estados Unidos para designar a un amplio territorio del país en donde existen las condiciones propicias para la formación de tornados. Aunque no existe una delimitación oficial, esta zona estaría comprendida entre las Montañas Rocosas y los Montes Apalaches. El área de las Grandes Llanuras es relativamente plana y esto permite que el aire polar de Canadá se encuentre con el aire tropical del Golfo de México. Cuando estas dos masas de aire se encuentran se forman la mayoría de los tornados.

Howard, 1995) y; las temperaturas medias en Madrid oscilan de 2,7°C a 32,1°C (AEM, 2014).

Respecto a la presencia de *Acanthamoeba* tanto a la entrada como a la salida de las ETAPs y EDARs no se observaron diferencias en ninguna de las plantas lo que pone de manifiesto la ineficiencia de los tratamientos actuales en la eliminación de este protozoo aunque hay que tener en cuenta que la normativa actual no contempla su control. Es importante recordar que es la forma quística de estas amebas la que confiere resistencia a los cambios de pH, ósmosis, temperatura e, incluso, a diferentes concentraciones de hipoclorito (Khan, 2009). Estos resultados coinciden con los observados en un estudio previo realizado en Francia en el que la presencia de *Acanthamoeba* se demostró tanto a la entrada como a la salida de una ETAP además de en puntos intermedios de la planta (Thomas y col., 2008). Se han descrito casos similares en Alemania donde Hoffman y Michel (2001) demostraron la resistencia de *Acanthamoeba* a diferentes tratamientos de potabilización, al igual que Edagawa (2009) en Japón.

A pesar de que la presencia de *Acanthamoeba* en diferentes tipos de agua se ha demostrado a lo largo de todo el mundo (ver página 26) no existe legislación que regule sus límites. En la "Directiva Europea para el Agua Potable" (98/83/CE) se establece que el agua destinada a consumo humano no debe contener microorganismos patógenos pero solo establece el control de bacterias fecales. En la legislación propia de nuestro país, se hace mención únicamente al control de *Cryptosporidium* (Real Decreto 140/2003) en agua potable. Respecto a las aguas residuales la legislación es todavía más escasa respecto al control de protozoos ya que ni siquiera se mencionan en la Directiva Europea 86/278/EEC. Hasta donde tenemos conocimiento, en el único país en el que se contempla a *Acanthamoeba* como un patógeno de transmisión hídrica es en Australia en su "*Australian Government National Water Quality Management Strategy Guidelines*" (2000) en la que no establecen el número mínimo permitido de amebas/ml pero sí recomiendan un control en determinadas aguas según el uso para el que estén destinadas tales como agua de uso en hospital, diálisis o estaciones lava-ojos.

En nuestro estudio, la presencia de *Acanthamoeba* en aguas superficiales (lagos, embalses y ríos) y en baños naturales ha sido, al igual que en las plantas de tratamiento de agua, muy elevada llegando al 100% en todos los baños estudiados. Estos datos pueden correlacionarse con estudios similares en piscinas alrededor del mundo donde también se ha observado una alta presencia de *Acanthamoeba* a pesar de tratarse de agua clorada. Encontramos como ejemplo los estudios de

Caumo y Rott (2011) en piscinas de Brasil donde detectaron *Acanthamoeba* T3, T4 y T5; de Init y col. (2010) en Malasia en el que encontraron estas amebas en las escaleras, paredes, cera del borde y en el centro de la pisciana; o el de Gianinazzi y col. (2010) en Suiza que identificaron diferentes AVL en los sistemas de filtración de las piscinas. Existen estudios también en lagos recreacionales de Malasia (Onichandran y col., 2013) con resultados muy similares a los observados en los baños naturales de la Comunidad de Madrid. Respecto a la presencia de *Acanthamoeba* observada en nuestro estudio en aguas superficiales en la zona centro de España, los valores oscilan entre 83,3% de muestras positivas y el 95,8% dependiendo de la estación y técnica utilizada en su detección. Estos valores son ligeramente superiores a los observados en aguas superficiales de Irán (70,3%) (Mahmoudi y col., 2012), en lagos de Polonia (65%) (Lass y col., 2014) o en la orilla de ríos de Taiwán(11,7%) (Kao y col., 2013a).

*N. fowleri*, otra de las AVL incluidas en el estudio, no pudo detectarse en ninguna de las muestras estudiadas. Aunque existen estudios en España que identifican *Naegleria* en distintas muestras ambientales, en ninguno de ellos, hasta donde nosotros conocemos, ha llegado a identificarse *N. fowleri* (García y col., 2011, García y col., 2013, Madrigal Sesma, 1988, Mascaro y col., 1981).

Hasta la fecha *B. mandrillaris* ha sido aislada únicamente de suelo, arena o polvo (Ahmad y col., 2011, Dunnebacke y col., 2003, 2004, Niyiyati y col., 2009, Schuster y col., 2003) y se considera un patógeno emergente debido a que los casos de encefalitis descritos por esta ameba han aumentado en los últimos diez años (Bravo y col., 2011). Aunque en España no hay ningún caso recogido de EGA por *B. mandrillaris*, si existe un caso descrito en un niño en Portugal, por lo que su presencia en España no sería descartable (Tavares y col., 2006). Aunque han existido varios intentos fallidos de localizar *B. mandrillaris* en agua (Gianinazzi y col., 2009, Gianinazzi y col., 2010), en nuestro estudio se presenta la primera descripción de *B. mandrillaris* en agua a nivel mundial.

#### **4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DE PATOGENICIDAD DE ACANTHAMOEBA EN MUESTRAS AMBIENTALES DE LA ZONA CENTRO DE ESPAÑA Y EN MUESTRAS CLÍNICAS**

La clasificación de las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* atendiendo a la morfología del quiste es una práctica que está siendo sustituida por la clasificación basada en el estudio del genotipo atendiendo a la secuencia del gen para la subunidad 18S del RNA ribosómico. En la actualidad hay descritos 18 genotipos nombrados como T1-T18. De estos 18

genotipos se han descrito como causantes de patología en el hombre el genotipo T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12, T15 y T18 (Booton y col., 2005, Maciver y col., 2013) correspondiendo el resto de genotipos a muestras ambientales. El genotipo T4 es el que se ha descrito con mayor frecuencia tanto en muestras ambientales como clínicas por lo que Booton y col. (2002) establecieron una subclasificación dentro de este genotipo atendiendo a la secuencia hipervariable de la región DF3 de la subunidad pequeña del 18S del ARNr. Esta clasificación del genotipo T4/DF3 es una herramienta muy útil en estudios epidemiológicos ya que permite distinguir entre cepas diferentes de un mismo punto de muestreo.

En los estudios realizados en la zona centro de España se ha detectado fundamentalmente el genotipo T4 con 17 variaciones en la secuencia DF3, nueve de ellas se describen por primera vez en los estudios 2 y 3 del presente trabajo. En menor frecuencia se han identificado también los genotipos T3, T11 y T19.

El genotipo T19 se describe por primera vez en el Estudio 4 del presente trabajo. Para su descripción se siguió el criterio de Stothard y col. (1998) en el que se establece que debe haber un 5 % de desigualdad entre los genotipos existentes y el nuevo, aunque actualmente este criterio no es tan estricto. La nueva secuencia varía respecto a los otros genotipos entre un 7,7 % y un 33 % por lo que cumplía las exigencias para su descripción como genotipo T19. Los estudios filogenéticos de este genotipo lo sitúan cercano a los genotipos T13, T15 y T16 que se han aislado también de muestras ambientales. Es importante destacar que aunque el genotipo T13 se ha aislado de la mucosa nasal y de lentes de contacto se considera un genotipo ambiental pues, hasta la fecha, no se ha asociado a patología (Booton y col., 2005). Los ensayos de termotolerancia y osmotolerancia realizados en nuestro estudio con la cepa USP-AWW-A68, cepa modelo del genotipo T19, la señalan como no patogénica lo que apoya su situación en los árboles filogenéticos.

Respecto a la distribución de los genotipos observados en nuestro estudio en las muestras ambientales, el genotipo T3 se encontró exclusivamente a la salida de una EDAR (Estudio 3) y el genotipo T11 en la entrada de una EDAR

(Estudio 3). El genotipo T4 fue el más común aislándose tanto a la entrada como la salida de ETAPs y EDARs así como en aguas terciarias de EDARs, lagos, embalses, ríos y baños naturales.

El análisis de los genotipos de *Acanthamoeba* hallados en plantas de tratamiento a la entrada y a la salida, mostró sorprendentemente una falta de concordancia de genotipo entre ambos puntos. Esto podría deberse a diferentes motivos. En primer lugar, tal y como se ha descrito previamente, es posible que tanto a la entrada como a la salida convivan varios genotipos y, por ello la detección a la entrada y a la salida sea diferente. Por otro lado, podrían existir nichos en el interior de las plantas de tratamiento que favoreciesen el crecimiento de dichas amebas tal y como postularon Thomas y Ashbolt (2011).

La patogenicidad de *Acanthamoeba* puede describirse, en base a su genotipo, dependiendo de que dicho genotipo se haya aislado de muestras clínicas. Todos los genotipos encontrados en nuestro estudio a excepción de T19 se corresponden con genotipos potencialmente patógenos para el hombre.

Existen varios métodos descritos para estudiar el potencial patógeno de *Acanthameoba*. Entre las técnicas *in vitro* destacan las pruebas de termotolerancia, osmotolerancia y efecto citopático sobre cultivos celulares como las más utilizadas. Según estas pruebas, la cepa de *Acanthamoeba* puede caracterizarse como potencialmente patógena si es capaz de crecer a temperaturas iguales o superiores a 37°C y en medios hiperosmóticos además de tener efecto citopático sobre cultivos celulares. Aunque estas características ofrecen una idea aproximada, no existe un consenso sobre cuál es la más indicada porque, aunque las citadas pruebas pueden tener su validez para infecciones del SNC, no parece ocurrir lo mismo para la QA (Schuster y Visvesvara, 2004b). En estudios previos se ha descrito que la temperatura puede no ser un factor limitante o característico de patogenicidad en el caso de QA ya que la temperatura ocular es ligeramente inferior a la temperatura del cuerpo (Schuster y Visvesvara, 2004b). Por todo ello, el modelo más apropiado para el estudio de la patogenicidad de

*Acanthamoeba* sigue siendo el modelo *in vivo* con ratones (De Jonckheere, 1980). Se ha desarrollado también un modelo *in vivo* en langosta (*Locusta migratoria*) (Mortazavi y col., 2009) como modelo para la infección del SNC.

Debido a ello, en el presente estudio se realizó un ensayo *in vivo* para corroborar el posible potencial patógeno de 6 de las cepas ambientales aisladas en el Estudio 1 clasificadas como genotipo T4. Se eligió para este estudio ratones desnudos ("nude") ya que presentan un sistema inmune debilitado al igual que la mayoría de los pacientes de EGA por *Acanthamoeba*. Los ratones se inocularon intranasalmente con  $10^6$  de trofozoítos y, antes de 9 días post-inoculación murieron o presentaron síntomas de afección neuronal como incoordinación motora, comportamientos aberrantes y ligera pérdida de peso por lo que fueron sacrificados. Por tanto, las seis cepas fueron capaces de establecer infección en el ensayo *in vivo* confirmándose así el potencial patógeno de estas cepas. Respecto a la patogenicidad del nuevo genotipo T19 no se realizaron ensayos *in vivo* ya que en los ensayos *in vitro* de termotolerancia y osmotolerancia no se encontraron indicadores de su posible patogenicidad.

Como ya hemos mencionado, *Acanthamoeba* produce en el hombre dos patologías diferentes fundamentalmente, una de ellas la infección de la córnea (QA) y la otra, la EGA. Aun así, *Acanthamoeba* puede producir además infecciones pulmonares o cutáneas muchas veces relacionadas con la EGA (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). En el presente estudio se incluyeron casos de QA y un caso de EGA. Para el estudio de QA se analizaron 44 muestras clínicas que se recibieron en el laboratorio entre el 2005 y el 2008 para su diagnóstico. Entre estas muestras se incluyeron raspados corneales, humor vítreo, lentes de contacto y sus soluciones. Se obtuvieron 9 muestras positivas que fueron genotipadas como T4 y caracterizadas de acuerdo a la secuencia T4/DF3. Siete de las muestras correspondían al genotipo T4/9 que también fue aislado en las ETAPs y EDARs estudiadas. Se identificaron además los genotipos T4/8 y T4/1 en sendas muestras clínicas. Aunque el genotipo T4/1 también ha sido identificado en los estudios ambientales hay que recalcar que el genotipo T4/8 fue el mayoritario en estos estudios. Esta identidad entre los aislados clínicos y ambientales subraya el alto contacto que existe entre el hombre y

*Acanthamoeba* como indican diferentes estudios inmunológicos en los que, en población sana, se ha observado una seroprevalencia frente a *Acanthamoeba* superior al 80 % (Chappell y col., 2001).

Respecto al caso de EGA presentado en este estudio, el diagnóstico se realizó por PCR en tiempo real en biopsia de SNC y en LCR aunque este último fue negativo. También se realizó inmunofluorescencia sobre cortes de encéfalo con anticuerpos policlonales anti-*Acanthamoeba* (Figura 14b) que permitió confirmar los resultados obtenidos previamente por PCR. La caracterización a nivel molecular no pudo realizarse por lo que su comparación con los aislados ambientales no fue factible.

#### **4.3 INTERACCIÓN DE *ACANTHAMOEBA* Y *LEGIONELLA* EN EL MEDIO AMBIENTE**

Existen varios estudios en los que se ha descrito el aislamiento de *Acanthamoeba* y *Legionella* del mismo punto de muestro demostrándose la coexistencia de ambos patógenos en el mismo nicho (Conza y col., 2013b, Huang y col., 2011). En el presente trabajo, además, de observar esta coexistencia se ha estudiado si los aislados ambientales de *Acanthamoeba* una vez clonados por dilución eran portadores de *Legionella*. Para ello se analizaron 51 cepas de *Acanthamoeba* aisladas de entradas y salidas de ETAPs y EDARs, agua terciaria de las EDARs y baños naturales. De las 51 cepas estudiadas 39 contenían *Legionella* en su interior aunque tan solo pudo identificarse la especie de *Legionella* en dos casos: *L. feeleii* y *L. falloni*. Los tres genotipos de *Acanthamoeba* aislados, T3, T4 y T11 presentaron *Legionella* en su interior al igual que el único aislado de *N. gruberi*. Este alto porcentaje de *Legionella* intraamebiana observado dista mucho del obtenido en un estudio similar realizado en Zaragoza donde encontraron que solo 6 de los 43 aislados de amebas presentaban *Legionella* en su interior (García y col., 2013) aunque, en este último estudio incluyeron otras especies de AVL que podrían no ser hospedadores para *Legionella*.

Hay que destacar que aunque no pudo identificarse *L. pneumophila* que es la especie de *Legionella* más asociada a patología humana, si se detectó por el contrario *L. feeleii*. El aislamiento de estas bacterias en el agua constituye actualmente el primer caso descrito en España. *L. feeleii* es una bacteria oportunista capaz de causar, además de legionelosis, celulitis y pericarditis (Loridant y col., 2011, Siegel y col., 2010). Aunque los casos descritos para dicha bacteria son escasos debido a la dificultad de su diagnóstico (Loridant y col., 2011, Siegel y col., 2010) su presencia en el medio ambiente tanto libre como simbionte de *Acanthamoeba* (lo que puede

incrementar su patogenicidad (Siddiqui y Khan, 2012)), convierten a esta bacteria en un patógeno a tener en cuenta a la hora del diagnóstico de neumonías bacterianas especialmente en población con el sistema inmune debilitado. Es importante destacar que para su detección resulta de especial importancia una buena sospecha clínica pues requiere de técnicas especiales al no estar incluida actualmente en los kits comerciales que se utilizan de rutina para la identificación de *Legionella*. Pudiendo por ello ser responsable de una parte de las neumonías que quedan sin tipar y, por lo tanto, no pueden asociarse a ningún agente etiológico.

*Legionella* a pesar de ser una bacteria bastante resistente que puede sobrevivir a temperaturas de 0°C a 63°C y a pH de 5 a 9,32 (Huang y col., 2011) necesita de otros microorganismos para proliferar en el medio (Rowbotham, 1980). Se han descrito hasta el momento 13 especies de amebas, entre ellas *Acanthamoeba* o *Naegleria*, además de algunos ciliados como posibles hospedadores ambientales. Hay que tener en cuenta que España es el segundo país europeo con mayor tasa de notificación de casos de legionelosis en Europa y que, además, tiene un número elevado de brotes de esta patología asociados a lugares reincidentes (ECDC, 2011). Los lugares reincidentes se describen como aquellos en los que se producen dos brotes de legionelosis con, por lo menos, 2 años de diferencia entre dichos brotes. Debido a que *Legionella* puede sobrevivir dentro de *Acanthamoeba* y que, esta última es altamente resistente a los tratamientos habituales de desinfección, esta interacción puede tener un papel fundamental en la reincidencia en aquellas localizaciones en las que aparentemente se habría aplicado un tratamiento para la desinfección de *Legionella*. Por todo ello, nuestro estudio revela la necesidad de buscar métodos que permitan una correcta eliminación de *Acanthamoeba*. Esto podría suponer también una solución para disminuir la presencia de *Legionella* en las diferentes muestras ambientales.

#### **4.4 UTILIDAD DEL CO-CULTIVO CON *ACANTHAMOEBA* PARA EL AISLAMIENTO DE *LEGIONELLA* EN MUESTRAS AMBIENTALES**

El co-cultivo de *Acanthamoeba* y *Legionella* se ha utilizado en el diagnóstico de casos de legionelosis por *Legionella* no *pneumofila* (Descours y col., 2012, La Scola y col., 2001, Marrie y col., 2001) y comienza a utilizarse en estudios medioambientales. Conza y col. (2013a) utilizando muestras de compost y de aire contaminadas experimentalmente con *Legionella* spp compararon la eficacia de recuperación de esta bacteria en cultivo en agar y del co-cultivo con *Acanthamoeba* resultando este último de mayor sensibilidad en casos de concentraciones menores de 10<sup>5</sup>- 10<sup>6</sup> ufc/g o ufc/m<sup>3</sup>. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio 3 ya que, se obtuvieron 53 de 58 puntos positivos para *Legionella* en co-cultivo y solo 4 por cultivo

en agar. Además, el número de muestras positivas obtenidas por PCR directa del concentrado de agua (41) fue, igualmente, inferior al del co-cultivo.

Las diferencias entre estas tres técnicas pueden explicarse por diferentes factores. La concentración de ufc en la muestra original es, probablemente, el factor limitante ya que, si nos basamos en los resultados obtenidos por Conza y col. (2013a) podemos suponer que la concentración de *Legionella* en las muestras es inferior a  $10^3$  ufc/l y, por tanto, su detección en cultivo directo en agar es muy baja. A esto hay que sumarle que *Legionella* puede permanecer en el ambiente como un organismo viable pero no cultivable en agar y que, en el caso de crecer, puede quedar enmascarada por otras bacterias de crecimiento más rápido. Las diferencias observadas entre co-cultivo y PCR pueden justificarse además de por la baja concentración de *Legionella* en las muestras por la posible presencia de inhibidores en las mismas pues, al tratarse de muestras ambientales, su composición es altamente variable y desconocida.

A pesar de que el co-cultivo de *Legionella* con *Acanthamoeba* es una técnica laboriosa y difícil de implementar en la rutina de un laboratorio clínico, los resultados obtenidos en nuestro estudio ponen de manifiesto la utilidad de esta técnica en el aislamiento de *Legionella* en muestras ambientales especialmente en los casos en los que el lugar de origen de un brote de legionelosis resulte difícil de determinar. Datos del "European Center for Disease Control" (ECDC, 2011) muestran que únicamente el 7,4% de los casos de legionelosis puede establecerse el foco de infección. Por todo ello el uso del co-cultivo se muestra como una herramienta eficaz para el estudio medioambiental de *Legionella* así como una posible herramienta de control de los brotes de legionelosis pues permitirá establecer un mayor número de focos que, a su vez, podrán ser eliminados.



---

## 5. CONCLUSIONES



## 5. CONCLUSIONES

- ✓ La presencia de AVL patógenas para el hombre, *Acanthamoeba* y *B. mandrillaris* detectada en diferentes tipos de agua de la Comunidad Autónoma de Madrid y su identidad genotípica con los aislados clínicos estudiados corroboran la transmisión hídrica como fuente de infección de dichos protozoos señalándola como un posible problema de salud pública.
- ✓ La descripción del tercer caso de EGA en España junto con los casos de QA presentados unido a la falta de tratamientos eficaces de eliminación sugieren que el único método de prevención actual posible es una adecuada educación sanitaria.
- ✓ El estudio molecular de *Acanthamoeba*, determinación de genotipos y de variabilidad genética dentro del genotipo T4, se presenta como una herramienta adecuada para estudios ambientales y de la eficiencia del tratamiento del agua en ETAPs y EDARs
- ✓ El co-cultivo de *Legionella* con *Acanthamoeba* se constituye como una herramienta útil para la detección de *Legionella* en muestras medioambientales
- ✓ El papel vectorial de *Acanthamoeba* respecto a *Legionella* queda demostrado en la zona centro de España lo que sugiere que para una completa eliminación de esta bacteria sería necesario un adecuado tratamiento antibacteriano así como antiprotozoario.
- ✓ Se describe por primera vez en España la presencia de *L. feeleii* en muestras ambientales de forma libre y como simbiote de *Acanthamoeba* lo que resulta de especial interés al no estar incluida actualmente dentro de la rutina diagnóstica de neumonías.



---

## 6. BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M. y Fields, B. (1996) "*Legionella*-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease". **Emerg Infect Dis** 2(3), 225-230.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A. y Spiegel, F.W. (2012) "The Revised Classification of Eukaryotes". **Journal of Eukaryotic Microbiology** 59(5), 429-514.
- AEM (2014) "Valores climatológicos normales. Madrid" Agencia Española de Meteorología [Último acceso: 03/06/2014] [www.aem.es](http://www.aem.es)
- Ahmad, A.F., Andrew, P.W. y Kilvington, S. (2011) "Development of a nested PCR for environmental detection of the pathogenic free-living amoeba *Balamuthia mandrillaris*". **J Eukaryot Microbiol** 58(3), 269-271.
- Aichelburg, A.C., Walochnik, J., Assadian, O., Prosch, H., Steuer, A., Perneczky, G., Visvesvara, G.S., Aspöck, H. y Vetter, N. (2008) "Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine". **Emerg Infect Dis** 14(11), 1743-1746.
- Alio, J.L., Abbouda, A., Valle, D.D., Del Castillo, J.M. y Fernandez, J.A. (2013) "Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases". **J Ophthalmic Inflamm Infect** 3(1), 47.
- Alizadeh, H., Apte, S., El-Agha, M.S., Li, L., Hurt, M., Howard, K., Cavanagh, H.D., McCulley, J.P. y Niederkorn, J.Y. (2001) "Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis". **Cornea** 20(6), 622-627.
- Alsam, S., Jeong, S.R., Dudley, R. y Khan, N.A. (2008) "Role of human tear fluid in *Acanthamoeba* interactions with the human corneal epithelial cells". **Int J Med Microbiol** 298(3-4), 329-336.
- Alves D de, S., Moraes, A.S., Nitz, N., de Oliveira, M.G., Hecht, M.M., Gurgel-Goncalves, R. y Cuba, C.A. (2012) "Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6

- isolated from environmental sources in Brasilia, Federal District, Brazil". **Exp Parasitol** 131(2), 239-244.
- Amann, R., Springer, N., Schonhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Muller, K.D. y Michel, R. (1997) "Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoebae* related to *Chlamydia* spp". **Appl Environ Microbiol** 63(1), 115-121.
  - Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A. y Kurtz, J.B. (1983) "Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*)". **J Hyg (Lond)** 91(2), 167-178.
  - Anderson, I.J., Watkins, R.F., Samuelson, J., Spencer, D.F., Majoros, W.H., Gray, M.W. y Loftus, B.J. (2005) "Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome". **Protist** 156(2), 203-214.
  - Arias Fernandez, M.C., Paniagua Crespo, E., Marti Mallen, M., Penas Ares, M.P. y Casro Casas, M.L. (1989) "Marine amoebae from waters of northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species". **J Protozool** 36(3), 239-241.
  - Astorga, B., Lorenzo-Morales, J., Martin-Navarro, C.M., Alarcon, V., Moreno, J., Gonzalez, A.C., Navarrete, E., Pinero, J.E. y Valladares, B. (2011) "*Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile". **J Eukaryot Microbiol** 58(6), 542-544.
  - Barbeau, J. y Buhler, T. (2001) "Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines". **Res Microbiol** 152(8), 753-760.
  - Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I. y Gilbert, P. (1992) "Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation". **Appl Environ Microbiol** 58(8), 2420-2425.
  - Barker, J., Lambert, P.A. y Brown, M.R. (1993) "Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*". **Infect Immun** 61(8), 3503-3510.
  - Barker, J. y Brown, M.R. (1994) "Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment". **Microbiology** 140 ( Pt 6), 1253-1259.

- Barker, J., Scaife, H. y Brown, M.R. (1995) "Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*". **Antimicrob Agents Chemother** 39(12), 2684-2688.
- Barker, J., Humphrey, T.J. y Brown, M.W. (1999) "Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease". **FEMS Microbiol Lett** 173(2), 291-295.
- Bhagwandeem, S.B., Carter, R.F., Naik, K.G. y Levitt, D. (1975) "A case of hartmannellid amebic meningoencephalitis in Zambia". **Am J Clin Pathol** 63(4), 483-492.
- Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Storey, C., Marrie, T.J. y Raoult, D. (1997) "*Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae". **Lancet** 349(9056), 925-926.
- Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Michel, R., Pitcher, D.G., Lascola, B., Alexiou-Daniel, S. y Raoult, D. (2000) "*Candidatus Odysella thessalonicensis* gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular parasite of *Acanthamoeba* species". **Int J Syst Evol Microbiol** 50 Pt 1, 63-72.
- Bomo, A.M., Stevik, T.K., Hovi, I. y Hanssen, J.F. (2004) "Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters". **J Environ Qual** 33(3), 1041-1047.
- Boost, M., Cho, P., Lai, S. y Sun, W.M. (2008) "Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction". **Optom Vis Sci** 85(7), 526-530.
- Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S., Byers, T.J. y Fuerst, P.A. (2002) "18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong". **J Clin Microbiol** 40(5), 1621-1625.
- Booton, G.C., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelly, D.J. y Fuerst, P.A. (2005) "Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections". **J Clin Microbiol** 43(4), 1689-1693.
- Borochovit, D., Martinez, A.J. y Patterson, G.T. (1981) "Osteomyelitis of a bone graft of the mandible with *Acanthamoeba castellanii* infection". **Hum Pathol** 12(6), 573-576.

- Bozue, J.A. y Johnson, W. (1996) "Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion". **Infect Immun** 64(2), 668-673.
- Bravo, F.G., Alvarez, P.J. y Gotuzzo, E. (2011) "*Balamuthia mandrillaris* infection of the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine". **Curr Opin Infect Dis** 24(2), 112-117.
- Brown, T.J., Cursons, R.T. y Keys, E.A. (1982) "Amoebae from antarctic soil and water". **Appl Environ Microbiol** 44(2), 491-493.
- Burger, G., Plante, I., Lonergan, K.M. y Gray, M.W. (1995) "The mitochondrial DNA of the amoeboid protozoon, *Acanthamoeba castellanii*: complete sequence, gene content and genome organization". **J Mol Biol** 245(5), 522-537.
- Butt, C.G. (1966) "Primary amebic meningoencephalitis". **N Engl J Med** 274(26), 1473-1476.
- Byers, T.J. (1986) "Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba*, and *Naegleria*". **Int Rev Cytol** 99, 311-341.
- Callicott, J.H., Nelson, E.C., Jones, M.M., dos Santos, J.G., Utz, J.P., Duma, R.J. y Morrison, J.V. (1968) "Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoebae. Report of two cases". **JAMA** 206(3), 579-582.
- Campos-Rodriguez, R., Oliver-Aguillon, G., Vega-Perez, L.M., Jarillo-Luna, A., Hernandez-Martinez, D., Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M.A., Rivera-Aguilar, V. y Gonzalez-Robles, A. (2004) "Human IgA inhibits adherence of *Acanthamoeba polyphaga* to epithelial cells and contact lenses". **Can J Microbiol** 50(9), 711-718.
- Cao, Z., Saravanan, C., Goldstein, M.H., Wu, H.K., Pasricha, G., Sharma, S. y Panjwani, N. (2008) "Effect of human tears on *Acanthamoeba*-induced cytopathic effect". **Arch Ophthalmol** 126(3), 348-352.
- Carlesso, A.M., Mentz, M.B., da Machado, M.L., Carvalho, A., Nunes, T.E., Maschio, V.J. y Rott, M.B. (2014) "Characterization of isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs". **Curr Microbiol** 68(6), 702-707.

- Casper, T., Basset, D., Leclercq, C., Fabre, J., Peyron-Raison, N. y Reynes, J. (1999) "Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy". **Clin Infect Dis** 29(4), 944-945.
- Castellani, A. (1930) "An amoeba found in culture of yeast: preliminary note". **J Trop Med Hyg**, 160.
- Caumo, K. y Rott, M.B. (2011) "*Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil". **Acta Trop** 117(3), 233-235.
- Cerva, L. y Novák, K. (1968) "Amoebic meningoencephalitis: 16 fatalities". **Science** 160(3823), 92.
- Cerva, L., Serbus, C. y Skocil, V. (1973) "Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man". **Folia Parasitol (Praha)** 20(1), 97-103.
- Cerva, L. (1989) "*Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man". **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol** 33(1), 99-103.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S. y Tompkins, L.S. (1999) "Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*". **Infect Immun** 67(9), 4427-4434.
- Clarke, B., Sinha, A., Parmar, D.N. y Sykakis, E. (2012) "Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis". **J Ophthalmol** 2012, 484892.
- Clarke, D.W. y Niederkorn, J.Y. (2006) "The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis". **Trends Parasitol** 22(4), 175-180.
- Clarke, M., Lohan, A.J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., Bertelli, C., Schilde, C., Kianianmomeni, A., Burglin, T.R., Frech, C., Turcotte, B., Kopec, K.O., Synnott, J.M., Choo, C., Paponov, I., Finkler, A., Heng Tan, C.S., Hutchins, A.P., Weinmeier, T., Rattei, T., Chu, J.S., Gimenez, G., Irimia, M., Rigden, D.J., Fitzpatrick, D.A., Lorenzo-Morales, J., Bateman, A., Chiu, C.H., Tang, P., Hegemann, P., Fromm, H., Raoult, D., Greub, G., Miranda-Saavedra, D., Chen, N., Nash, P., Ginger, M.L., Horn, M., Schaap, P., Caler, L. y Loftus, B.J. (2013) "Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling". **Genome Biol** 14(2), R11.

- Conza, L., Casati, S. y Gaia, V. (2013a) "Detection limits of *Legionella pneumophila* in environmental samples after co-culture with *Acanthamoeba polyphaga*". **BMC Microbiol** 13, 49.
- Conza, L., Pagani, S.C. y Gaia, V. (2013b) "Presence of *Legionella* and free-living Amoebae in composts and bioaerosols from composting facilities". **Plos One** 8(7), e68244.
- Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F. y Greub, G. (2010) "Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants". **Int J Hyg Environ Health** 213(3), 158-166.
- Corsaro, D. y Venditti, D. (2010) "Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida)". **Parasitol Res** 107(1), 233-238.
- Corsaro, D. y Venditti, D. (2011) "More *Acanthamoeba* genotypes: Limits to the use of rDNA fragments to describe new genotypes". **Acta Protozoologica** 50, 49-54.
- Costas, M. y Griffiths, A.J. (1984) "The esterases and acid-phosphatases of *Acanthamoeba* (Amoebida, Acanthamoebidae)". **Protistologica** 20, 33-41.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W., Cohen, H.K. y Minner, J.R. (1959) "Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*". **Am J Pathol** 35(1), 185-197.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W. y Minner, J.R. (1958) "*Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity". **Science** 127(3313), 1506.
- Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M. y Till, D. (1980) "Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody". **Infect Immun** 29(2), 401-407.
- Chandrasekar, P.H., Nandi, P.S., Fairfax, M.R. y Crane, L.R. (1997) "Cutaneous infections due to *Acanthamoeba* in patients with acquired immunodeficiency syndrome". **Arch Intern Med** 157(5), 569-572.
- Chang, C.W. y Wu, Y.C. (2010) "Evaluation of DNA extraction methods and dilution treatment for detection and quantification of *Acanthamoeba* in water and biofilm by real-time PCR". **Water Sci Technol** 62(9), 2141-2149.

- Chappell, C.L., Wright, J.A., Coletta, M. y Newsome, A.L. (2001) "Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects". **Clin Diagn Lab Immunol** 8(4), 724-730.
- da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H.B. y Marciano-Cabral, F. (2009) "Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae". **Interdiscip Perspect Infect Dis** 2009, 251406.
- Danes, L. y Cerva, L. (1981) "Survival of polioviruses and echoviruses in *Acanthamoeba castellanii* cultivated in vitro". **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol** 25(2), 169-174.
- De Jonckheere, J.F. (1979) "Occurrence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in aquaria". **Appl Environ Microbiol** 38(4), 590-593.
- De Jonckheere, J.F. (1980) "Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp". **Appl Environ Microbiol** 39(4), 681-685.
- De Jonckheere, J.F. (2007) "Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA)". **Eur J Protistol** 43(1), 9-15.
- Descours, G., Suet, A., Ginevra, C., Campese, C., Slimani, S., Ader, F., Che, D., Lina, G. y Jarraud, S. (2012) "Contribution of amoebic coculture to recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months". **J Clin Microbiol** 50(5), 1725-1726.
- Douesnard-Malo, F. y Daigle, F. (2011) "Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*". **Appl Environ Microbiol** 77(21), 7640-7646.
- Drozanski, W. (1956) "Fatal bacterial infection in soil amoebae". **Acta Microbiol Pol** 5(3-4), 315-317.
- Dunnebacke, T.H., Schuster, F.L., Yagi, S. y Booton, G.C. (2003) "Isolation of *Balamuthia* amebas from the environment". **J Eukaryot Microbiol** 50 Suppl, 510-511.
- Dunnebacke, T.H., Schuster, F.L., Yagi, S. y Booton, G.C. (2004) "*Balamuthia mandrillaris* from soil samples". **Microbiology** 150(Pt 9), 2837-2842.
- Durán de la Colina, J.A. (1998) *Complicaciones de las lentes de contacto*, Tecnimedia editorial, Madrid.

- Dykova, I. y Lom, J. (2004) "Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish". **Folia Parasitol (Praha)** 51(2-3), 81-97.
- ECDC (2011) "Legionnaires' disease in Europe 2009". **European Centre for Disease Prevention and Control**.
- Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusuhara, Y. y Karanis, P. (2009) "Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan". **Parasitol Res** 105(4), 1109-1117.
- Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U. y Marre, R. (1997) "Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*". **Appl Environ Microbiol** 63(4), 1396-1399.
- Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., G, C.G. y Brown, B.L. (2003) "Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA". **Parasitol Res** 89(1), 6-15.
- Feingold, J.M., Abraham, J., Bilgrami, S., Ngo, N., Visvesara, G.S., Edwards, R.L. y Tutschka, P.J. (1998) "*Acanthamoeba* meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation". **Bone Marrow Transplant** 22(3), 297-300.
- Fowler, M. y Carter, R.F. (1965) "Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report". **Br Med J** 2(5464), 740-742.
- Friedland, L.R., Raphael, S.A., Deutsch, E.S., Johal, J., Martyn, L.J., Visvesvara, G.S. y Lischner, H.W. (1992) "Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection". **Pediatr Infect Dis J** 11(5), 404-407.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R.K., Schleifer, K.H. y Wagner, M. (1999) "In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales". **Appl Environ Microbiol** 65(1), 206-212.
- Galarza, C., Ramos W Fau - Gutierrez, E.L., Gutierrez El Fau - Ronceros, G., Ronceros G Fau - Teran, M., Teran M Fau - Uribe, M., Uribe M Fau - Navincopa, M., Navincopa M Fau - Ortega-Loayza, A.G. y Ortega-Loayza, A.G. (2009) "Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients". **Int J Dermatol**. 48(12), 1324-1329. doi: 1310.1111/j.1365-4632.2008.03786.x.

- Gao, L.Y. y Kwaik, Y.A. (2000) "The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*". **Environ Microbiol** 2(1), 79-90.
- Garate, M., Marchant, J., Cubillos, I., Cao, Z., Khan, N.A. y Panjwani, N. (2006) "In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein". **Invest Ophthalmol Vis Sci** 47(3), 1056-1062.
- Garcia, A., Goni, P., Clavel, A., Lobeiz, S., Fernandez, M.T. y Ormad, M.P. (2011) "Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants". **Environ Microbiol Rep** 3(5), 622-626.
- Garcia, A., Goni, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M.T., Calvo-Begueria, L., Rubio, E., Fillat, M.F., Peleato, M.L. y Clavel, A. (2013) "Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques". **Environ Sci Technol** 47(7), 3132-3140.
- Garner, A. (1993) "Pathogenesis of acanthamoebic keratitis: hypothesis based on a histological analysis of 30 cases". **Br J Ophthalmol** 77(6), 366-370.
- Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuerst, P.A. y Byers, T.J. (1996) "Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types". **J Eukaryot Microbiol** 43(6), 498-504.
- Gaze, W.H., Morgan, G., Zhang, L. y Wellington, E.M. (2011) "Mimivirus-like particles in *Acanthamoebae* from Sewage Sludge". **Emerg Infect Dis** 17(6), 1127-1129.
- Gee Sn Fau - Rothschild, B., Rothschild B Fau - Click, J., Click J Fau - Sheth, V., Sheth V Fau - Saavedra, A., Saavedra A Fau - Hsu, M.-Y. y Hsu, M.Y. (2011) "Tender ulceronecrotic nodules in a patient with leukemia. Cutaneous acanthamebiasis". **Arch Dermatol.** 147(7), 857-862. doi: 810.1001/archdermatol.2011.1162-a.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Wuthrich, F., Muller, N., Schurch, N. y Gottstein, B. (2009) "Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland". **Exp Parasitol** 121(2), 180-186.

- Gianinazzi, C., Schild, M., Zumkehr, B., Wuthrich, F., Nuesch, I., Ryter, R., Schurch, N., Gottstein, B. y Muller, N. (2010) "Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae". **Exp Parasitol** 126(1), 45-53.
- Gomez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E. y Ares-Mazas, E. (2007) "*Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*". **Parasitol Res** 100(5), 1151-1154.
- Gray, T.B., Cursons, R.T., Sherwan, J.F. y Rose, P.R. (1995) "*Acanthamoeba*, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases". **Br J Ophthalmol** 79(6), 601-605.
- Greub, G. y Raoult, D. (2004) "Microorganisms resistant to free-living amoebae". **Clin Microbiol Rev** 17(2), 413-433.
- Gupta, T., Fine-Coulson, K., Karls, R., Gauthier, D. y Quinn, F. (2013) "Internalization of *Mycobacterium shottsii* and *Mycobacterium pseudoshottsii* by *Acanthamoeba polyphaga*". **Can J Microbiol** 59(8), 570-576.
- Hall, J. y Voelz, H. (1985) "Bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* sp". **J Parasitol** 71(1), 89-95.
- Harwood, C.R., Rich, G.E., McAleer, R. y Cherian, G. (1988) "Isolation of *Acanthamoeba* from a cerebral abscess". **Med J Aust** 148(1), 47-49.
- Hassan, A., Farouk, H., Hassanein, F., Abdul-Ghani, R. y Abdelhady, A.H. (2012) "*Acanthamoeba* contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: a neglected potential source of infection". **J Infect Public Health** 5(4), 304-310.
- Hewett, M.K., Robinson, B.S., Monis, P.T. y Saint, C.P. (2003) "Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae)". **Acta Protozoologica** 42, 325-329.
- Hoffmann, R., Michel, R., Muller, K.D. y Schmid, E.N. (1998) "Archea like endocytobiotic organism isolated from *Acanthamoeba* sp (GR II)". **Endocytobiosis Cell Res.** 12, 185-188.

- Hoffmann, R. y Michel, R. (2001) "Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water". **Int J Hyg Environ Health** 203(3), 215-219.
- Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H. y Wagner, M. (1999) "Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*". **Environ Microbiol** 1(4), 357-367.
- Huang, S.W., Hsu, B.M., Chen, N.H., Huang, C.C., Huang, K.H., Chen, J.S. y Kao, P.M. (2011) "Isolation and identification of *Legionella* and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR". **Parasitol Res** 109(5), 1233-1241.
- Init, I., Lau, Y.L., Arin Fadzlun, A., Foad, A.I., Neilson, R.S. y Nissapatorn, V. (2010) "Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia". **Trop Biomed** 27(3), 566-577.
- Jager, B.V. y Stamm, W.P. (1972) "Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease". **Lancet** 2(7791), 1343-1345.
- Jahnes, W.G. y Fullmer, H.M. (1957) "Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture". **Proc Soc Exp Biol Med** 96(2), 484-488.
- Jaison, P.L., Cao, Z. y Panjwani, N. (1998) "Binding of *Acanthamoeba* to [corrected] mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury". **Curr Eye Res** 17(8), 770-776.
- Jeong, H.J. y Yu, H.S. (2005) "The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea". **Korean J Parasitol** 43(2), 47-50.
- Jeong, H.J., Jang, E.S., Han, B.I., Lee, K.H., Ock, M.S., Kong, H.H., Chung, D.I., Seol, S.Y., Cho, D.T. y Yu, H.S. (2007) "*Acanthamoeba*: could it be an environmental host of *Shigella*?". **Exp Parasitol** 115(2), 181-186.
- John, D.T. y Howard, M.J. (1995) "Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters". **Parasitol Res** 81(3), 193-201.
- Jones, D.B., Visvesvara, G.S. y Robinson, N.M. (1975) "*Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis". **Trans Ophthalmol Soc U K** 95(2), 221-232.

- Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M. y Friedman, M.G. (2001) "Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts". **Appl Environ Microbiol** 67(10), 4789-4795.
- Kahane, S., Platzner, N., Dvoskin, B., Itzhaki, A. y Friedman, M.G. (2004) "Evidence for the presence of *Simkania negevensis* in drinking water and in reclaimed wastewater in Israel". **Appl Environ Microbiol** 70(6), 3346-3351.
- Kao, P.M., Hsu, B.M., Chen, N.H., Huang, K.H., Huang, S.W., King, K.L. y Chiu, Y.C. (2012) "Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan". **Exp Parasitol** 130(4), 354-358.
- Kao, P.M., Chou, M.Y., Tao, C.W., Huang, W.C., Hsu, B.M., Shen, S.M., Fan, C.W. y Chiu, Y.C. (2013a) "Diversity and seasonal impact of *Acanthamoeba* species in a subtropical rivershed". **Biomed Res Int** 2013, 405794.
- Kao, P.M., Tung, M.C., Hsu, B.M., Tsai, H.L., She, C.Y., Shen, S.M. y Huang, W.C. (2013b) "Real-time PCR method for the detection and quantification of *Acanthamoeba* species in various types of water samples". **Parasitol Res** 112(3), 1131-1136.
- Khalife, G., Pambuccian, S., Visvesvara, G. y Horten, B. (1994) "Disseminated *Acanthamoeba* infection masquerading as bacillary angiomatosis in a patient with AIDS.". **Int. J. Surg. Pathol.** 2, 11-16.
- Khan, N.A. y Tareen, N.K. (2003) "Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains". **Folia Parasitol (Praha)** 50(2), 97-104.
- Khan, N.A. (2009) *Acanthamoeba*. Biology and Pathogenesis., Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J.R., Frazer, D.G. y Matheson, M. (2004) "*Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom". **Invest Ophthalmol Vis Sci** 45(1), 165-169.
- Koide, J., Okusawa, E., Ito, T., Mori, S., Takeuchi, T., Itoyama, S. y Abe, T. (1998) "Granulomatous amoebic encephalitis caused by

- Acanthamoeba* in a patient with systemic lupus erythematosus". **Clin Rheumatol** 17(4), 329-332.
- Kong, H.H., Kim, T.H. y Chung, D.I. (2000) "Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE". **J Parasitol** 86(1), 12-17.
  - Krishna-Prasad, B.N. y Gupta, S.K. (1978) "Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas". **Curr Sci** 47, 245-247.
  - La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P.J. y Raoult, D. (2001) "Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure". **J Clin Microbiol** 39(1), 365-366.
  - La Scola, B. y Raoult, D. (2001) "Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*". **Clin Microbiol Infect** 7(2), 75-79.
  - La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M. y Raoult, D. (2003) "A giant virus in amoebae". **Science** 299(5615), 2033.
  - Lahiri, R. y Krahenbuhl, J.L. (2008) "The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle". **Lepr Rev** 79(4), 401-409.
  - Landell, M.F., Salton, J., Caumo, K., Broetto, L. y Rott, M.B. (2013) "Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil". **Exp Parasitol** 134(3), 290-294.
  - Langmark, J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J. y Stenstrom, T.A. (2007) "The effects of UV disinfection on distribution pipe biofilm growth and pathogen incidence within the greater Stockholm area, Sweden". **Water Res** 41(15), 3327-3336.
  - Łanocha, N., Kosik-Bogacka, D., Maciejewska, A., Sawczuk, M., Wilk, A. y Kuźna-Grygiel, W. (2009) "The Occurrence *Acanthamoeba* (Free Living Amoeba) in Environmental and Respiratory Samples in Poland". **Acta Protozoologica** 48(3), 271-279.
  - Larkin, D.F., Kilvington, S. y Easty, D.L. (1990) "Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria". **Br J Ophthalmol** 74(3), 133-135.

- Lass, A., Szostakowska, B., Idzinska, A. y Chomicz, L. (2014) "The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated from natural water reservoirs in Poland". **Parasitol Res**.
- Laummaunwai, P., Ruangjirachuporn, W. y Boonmars, T. (2012) "A simple PCR condition for detection of a single cyst of *Acanthamoeba* species". **Parasitol Res** 110(4), 1569-1572.
- Leher, H., Kinoshita, K., Alizadeh, H., Zaragoza, F.L., He, Y. y Niederkorn, J. (1998a) "Impact of oral immunization with *Acanthamoeba* antigens on parasite adhesion and corneal infection". **Invest Ophthalmol Vis Sci** 39(12), 2337-2343.
- Leher, H., Zaragoza, F., Taherzadeh, S., Alizadeh, H. y Niederkorn, J.Y. (1999) "Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba* keratitis". **Exp Eye Res** 69(1), 75-84.
- Leher, H.F., Alizadeh, H., Taylor, W.M., Shea, A.S., Silvany, R.S., Van Klink, F., Jager, M.J. y Niederkorn, J.Y. (1998b) "Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis". **Invest Ophthalmol Vis Sci** 39(13), 2666-2673.
- Liu, H., Ha, Y.R., Lee, S.T., Hong, Y.C., Kong, H.H. y Chung, D.I. (2006) "Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolated from ocean sediments". **Korean J Parasitol** 44(2), 117-125.
- Lorenzo-Morales, J., Lindo, J.F., Martinez, E., Calder, D., Figueruelo, E., Valladares, B. y Ortega-Rivas, A. (2005a) "Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies". **Ann Trop Med Parasitol** 99(8), 751-758.
- Lorenzo-Morales, J., Monteverde-Miranda, C.A., Jimenez, C., Tejedor, M.L., Valladares, B. y Ortega-Rivas, A. (2005b) "Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain". **Ann Agric Environ Med** 12(2), 233-236.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E. y Valladares, B. (2005c) "Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources". **Parasitol Res** 95(4), 273-277.
- Lorenzo-Morales, J., Coronado-Alvarez, N., Martinez-Carretero, E., Maciver, S.K. y Valladares, B. (2007) "Detection of four adenovirus

- serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain". **Am J Trop Med Hyg** 77(4), 753-756.
- Lorenzo-Morales, J., Martin-Navarro, C.M., Lopez-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Pinero, J.E. y Valladares, B. (2013) "*Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?". **Trends Parasitol** 29(4), 181-187.
  - Loridant, S., Lagier, J.C. y La Scola, B. (2011) "Identification of *Legionella feeleii* cellulitis". **Emerg Infect Dis** 17(1), 145-146.
  - Ly, T.M. y Muller, H.E. (1990) "Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa". **J Med Microbiol** 33(1), 51-54.
  - Maciver, S.K., Asif, M., Simmen, M.W. y Lorenzo-Morales, J. (2013) "A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype". **Eur J Protistol** 49(2), 217-221.
  - Madrigal Sesma, M.J. (1988) "[Isolation of free-living amoebae, potentially pathogenic for humans, from 3 species of saurians from the western Canary Islands]". **Rev Sanid Hig Publica (Madr)** 62(1-4), 1405-1409.
  - Mahmoudi, M.R., Taghipour, N., Eftekhar, M., Haghghi, A. y Karanis, P. (2012) "Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran". **Parasitol Res** 110(1), 473-477.
  - Marciano-Cabral, F. y Toney, D.M. (1998) "The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines". **J Eukaryot Microbiol** 45(4), 452-458.
  - Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R. y Cabral, G.A. (2000) "The increasing importance of *Acanthamoeba* infections". **J Eukaryot Microbiol** 47(1), 29-36.
  - Marciano-Cabral, F., Ferguson, T., Bradley, S.G. y Cabral, G. (2001) "Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), the major psychoactive component of marijuana, exacerbates brain infection by *Acanthamoeba*". **J Eukaryot Microbiol** Suppl, 4s-5s.
  - Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. (2003) "*Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans". **Clin Microbiol Rev** 16(2), 273-307.

- Marciano-Cabral, F. (2009) "Free-living amoebae as agents of human infection". **J Infect Dis** 199(8), 1104-1106.
- Maritschnegg, P., Sovinz, P., Lackner, H., Benesch, M., Nebl, A., Schwinger, W., Walochnik, J. y Urban, C. (2011) "Granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen". **J Clin Microbiol** 49(1), 446-448.
- Marrie, T.J., Raoult, D., La Scola, B., Birtles, R.J. y de Carolis, E. (2001) "*Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia". **Emerg Infect Dis** 7(6), 1026-1029.
- Martin-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Rancel, F., Coronado-Alvarez, N.M., Pinero, J.E. y Valladares, B. (2008) "The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain". **J Med Microbiol** 57(Pt 11), 1399-1404.
- Martinez, A.J. (1982) "Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report". **J Neuropathol Exp Neurol** 41(5), 548-557.
- Martínez, A.J. (1980) "Primary amebic meningoencephalitis". **Neurosurgery** 6(5), 613-614.
- Mascaró, C., Fluvia, C., Osuna, A. y Guevara, D. (1981) "Virulent *Naegleria* sp. isolated from a river in Cadiz (Spain)". **J Parasitol** 67(4), 599.
- Masihi, K.N., Bhaduri, C.R., Werner, H., Janitschke, K. y Lange, W. (1986) "Effects of muramyl dipeptide and trehalose dimycolate on resistance of mice to *Toxoplasma gondii* and *Acanthamoeba culbertsoni* infections". **Int Arch Allergy Appl Immunol** 81(2), 112-117.
- Massilamany, C., Steffen, D. y Reddy, J. (2010) "An epitope from *Acanthamoeba castellanii* that cross-react with proteolipid protein 139-151-reactive T cells induces autoimmune encephalomyelitis in SJL mice". **J Neuroimmunol** 219(1-2), 17-24.
- Massilamany, C., Asojo, O.A., Gangaplara, A., Steffen, D. y Reddy, J. (2011) "Identification of a second mimicry epitope from *Acanthamoeba castellanii* that induces CNS autoimmunity by generating cross-reactive T cells for MBP 89-101 in SJL mice". **Int Immunol** 23(12), 729-739.

- Mattana, A., Serra, C., Mariotti, E., Delogu, G., Fiori, P.L. y Cappuccinelli, P. (2006) "*Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses". **Eukaryot Cell** 5(4), 665-671.
- Meeney, A. y Mudhar, H.S. (2013) "Histopathological reporting of corneal pathology by a biomedical scientist: the Sheffield Experience". **Eye (Lond)** 27(2), 272-276.
- Mehlitz, A., Karunakaran, K., Herweg, J.A., Krohne, G., van de Linde, S., Rieck, E., Sauer, M. y Rudel, T. (2014) "The chlamydial organism *Simkania negevensis* forms ER vacuole contact sites and inhibits ER-stress". **Cell Microbiol.**
- Michel, R., Burghardt, H. y Bergmann, H. (1995) "[*Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital]". **Zentralbl Hyg Umweltmed** 196(6), 532-544.
- Michel, R. y Hauröder, B. (1997) "Isolation of an *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection". **Zentralbl Bakteriol** 285(4), 541-557.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. y Abu Kwaik, Y. (2005) "Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens". **Applied and Environmental Microbiology** 71(1), 20-28.
- Mortazavi, P.N., Goldsworthy, G., Kirk, R. y Khan, N.A. (2009) "Novel model for the in vivo study of central nervous system infection due to *Acanthamoeba* spp. (T4 genotype)". **J Med Microbiol** 58(Pt 4), 503-508.
- Munson, D.A. y Paget, T.A. (2006) "Distribution of *Acanthamoeba* in more and less polluted North Sea coastal sediments". **J Eukaryot Microbiol** 53 Suppl 1, S12-14.
- Murakawa, G.J., McCalmont, T., Altman, J., Telang, G.H., Hoffman, M.D., Kantor, G.R. y Berger, T.G. (1995) "Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature". **Arch Dermatol** 131(11), 1291-1296.
- Neefs, J.M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S. y De Wachter, R. (1993) "Compilation of small ribosomal subunit RNA structures". **Nucleic Acids Res** 21(13), 3025-3049.

- Nerad, T.A., Sawyer, T.K., Lewis, E.J. y McLaughlin, S.M. (1995) "*Acanthamoeba pearcei* n. sp. (Protozoa: Amoebida) from sewage contaminated sediments". **J Eukaryot Microbiol** 42(6), 702-705.
- Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Dietz, K., Northoff, H. y Lang, F. (2000) "Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes". **Appl Environ Microbiol** 66(3), 914-919.
- Newsome, A.L., Curtis, F.T., Culbertson, C.G. y Allen, S.D. (1992) "Identification of *Acanthamoeba* in bronchoalveolar lavage specimens". **Diagn Cytopathol** 8(3), 231-234.
- Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H., Leher, H. y McCulley, J.P. (1999) "The pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*". **Microbes Infect** 1(6), 437-443.
- Niyiyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaeian, M., Martin-Navarro, C.M., Hagh, A.M., Maciver, S.K. y Valladares, B. (2009) "Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement". **Parasitol Res** 106(1), 279-281.
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L. y Jongwutiwes, S. (2010) "Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand". **J Clin Microbiol** 48(12), 4636-4640.
- Ofori-Kwakye, S.K., Sidebottom, D.G., Herbert, J., Fischer, E.G. y Visvesvara, G.S. (1986) "Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*. Case report". **J Neurosurg** 64(3), 505-509.
- Olofsson, J., Axelsson-Olsson, D., Brudin, L., Olsen, B. y Ellstrom, P. (2013) "*Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles". **Plos One** 8(11), e78873.
- Onichandran, S., Kumar, T., Lim, Y.A., Sawangjaroen, N., Andiappan, H., Salibay, C.C., Chye, T.T., Ithoi, I., Dungca, J.Z., Sulaiman, W.Y., Ling, L.Y. y Nissapatorn, V. (2013) "Waterborne parasites and physico-chemical assessment of selected lakes in Malaysia". **Parasitol Res** 112(12), 4185-4191.

- Orosz, E., Farkas, A., Kodobocz, L., Becsagh, P., Danka, J., Kucsera, I. y Fuleky, G. (2013) "Isolation of *Acanthamoeba* from the rhizosphere of maize and lucerne plants". **Acta Microbiol Immunol Hung** 60(1), 29-39.
- Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J.O., 3rd, Iseman, M.D., Reynolds, P.R., McDonnell, G. y Thomas, V. (2013) "Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*". **Appl Environ Microbiol** 79(10), 3185-3192.
- Page, F.C. (1967) "Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species". **J Protozool** 14(4), 709-724.
- Paltiel, M., Powell E Fau - Lynch, J., Lynch J Fau - Baranowski, B., Baranowski B Fau - Martins, C. y Martins, C. (2004) "Disseminated cutaneous acanthamebiasis: a case report and review of the literature". **Cutis**. 73(4), 241-248.
- Panjwani, N. (2010) "Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*". **Ocul Surf** 8(2), 70-79.
- Patras, D. y Andujar, J.J. (1966) "Meningoencephalitis due to *Hartmannella (Acanthamoeba)*". **Am J Clin Pathol** 46(2), 226-233.
- Penas Ares, M., Paniagua Crespo, E., Madrinan Choren, R., Marti Mallen, M. y Arias Fernandez, M.C. (1994) "Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in N.W. Spain". **Water, Air and Soil Pollution** 78, 83-90.
- Pens, C.J., da Costa, M., Fadanelli, C., Caumo, K. y Rott, M. (2008) "*Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles". **Parasitol Res** 103(6), 1241-1245.
- Pérez-Irezábal, J., Isasa, P., Barrón, J. y Martínez, I. (2005) Queratitis por *Acanthamoeba*, Página web de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Powell, E.L., Newsome, A.L., Allen, S.D. y Knudson, G.B. (1994) "Identification of antigens of pathogenic free-living amoebae by protein immunoblotting with rabbit immune and human sera". **Clin Diagn Lab Immunol** 1(5), 493-499.

- Preston, T.M., Richards, H. y Wotton, R.S. (2001) "Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds". **FEMS Microbiol Lett** 194(2), 143-147.
- Proca-Ciobanu, M., Lupascu, G.H., Petrovici, A. y Ionescu, M.D. (1975) "Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellani* strain: the presence of bacterial endosymbionts". **Int J Parasitol** 5(1), 49-56.
- Pussard, M. (1966) "Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931. (Hartmannellidae-Amoebida)". **Protistologica** 2, 71-93.
- Pussard, M. y Pons, R. (1977) "Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida)". **Protistologica** 13, 557-610.
- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R. y da Silva, A.J. (2006) "Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*". **J Clin Microbiol** 44(10), 3589-3595.
- Qvarnstrom, Y., Nerad, T.A. y Visvesvara, G.S. (2013) "Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis". **J Eukaryot Microbiol** 60(6), 626-633.
- Rahdar, M., Niyayati, M., Salehi, M., Feghhi, M., Makvandi, M., Pourmehdi, M. y Farnia, S. (2012) "Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in ahvaz city, khuzestan province, southern Iran". **Iran J Parasitol** 7(4), 22-26.
- Ramirez, E., Robles, E. y Martinez, B. (2010) "Free-living amoebae isolated from water-hyacinth root (*Eichhornia crassipes*)". **Exp Parasitol** 126(1), 42-44.
- Rezaei Kanavi, M., Hosseini, B., Javadi, F., Rakhshani, N. y Javadi, M.A. (2013) "Impression cytology in eyes with clinical and confocal scan features of *Acanthamoeba* keratitis". **J Ophthalmic Vis Res** 8(3), 207-212.
- Rimm, D.L., Pollard, T.D. y Hieter, P. (1988) "Resolution of *Acanthamoeba castellanii* chromosomes by pulsed field gel electrophoresis and construction of the initial linkage map". **Chromosoma** 97(3), 219-223.

- Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., Chavez, M., Gomez, R., Chio, R.E. y Islas, J. (1986) "Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II". **Environ Res** 39(2), 364-371.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994) "Ecology of free-living amoebae". **Crit Rev Microbiol** 20(3), 225-241.
- Rowbotham, T.J. (1980) "Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae". **J Clin Pathol** 33(12), 1179-1183.
- Sadaka, H.A., el-Nassery, S.F., abou Samra, L.M. y Awadalla, H.N. (1994) "Isolation and identification of free-living amoebae from some water sources in Alexandria". **J Egypt Soc Parasitol** 24(2), 247-257.
- Sangruchi, T., Martinez, A.J. y Visvesvara, G.S. (1994) "Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand". **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 25(2), 309-313.
- Sawyer, T.K., Visvesvara, G.S. y Harke, B.A. (1977) "Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp.". **Science** 196(4296), 1324-1325.
- Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A. y Byers, T.J. (2001) "Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge". **J Clin Microbiol** 39(5), 1903-1911.
- Schulz, F., Lagkouvardos, I., Wascher, F., Aistleitner, K., Kostanjsek, R. y Horn, M. (2014) "Life in an unusual intracellular niche: a bacterial symbiont infecting the nucleus of amoebae". **ISME J**.
- Schuster, F.L. (2002) "Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas". **Clin Microbiol Rev** 15(3), 342-354.
- Schuster, F.L., Dunnebacke, T.H., Booton, G.C., Yagi, S., Kohlmeier, C.K., Glaser, C., Vugia, D., Bakardjiev, A., Azimi, P., Maddux-Gonzalez, M., Martinez, A.J. y Visvesvara, G.S. (2003) "Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis". **J Clin Microbiol** 41(7), 3175-3180.

- Schuster, F.L. y Visvesvara, G.S. (2004a) "Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment". **Drug Resist Updat** 7(1), 41-51.
- Schuster, F.L. y Visvesvara, G.S. (2004b) "Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals". **Int J Parasitol** 34(9), 1001-1027.
- Schuster, F.L., Guglielmo, B.J. y Visvesvara, G.S. (2006) "In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*". **J Eukaryot Microbiol** 53(2), 121-126.
- Seal, D., Stapleton, F. y Dart, J. (1992) "Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers". **Br J Ophthalmol** 76(7), 424-427.
- Seal, D.V. (2003) "*Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment". **Eye (Lond)** 17(8), 893-905.
- Shanan, S., Abd, H., Hedenstrom, I., Saeed, A. y Sandstrom, G. (2011) "Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan". **BMC Res Notes** 4, 109.
- Sharma, S., Garg, P. y Rao, G.N. (2000) "Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis". **Br J Ophthalmol** 84(10), 1103-1108.
- Shin, H.J., Cho, M.S., Kim, H.I., Lee, M., Park, S., Sohn, S. y Im, K.I. (2000) "Apoptosis of primary-culture rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba* spp". **Clin Diagn Lab Immunol** 7(3), 510-514.
- Shin, H.J., Cho, M.S., Jung, S.Y., Kim, H.I., Park, S., Seo, J.H., Yoo, J.C. y Im, K.I. (2001) "Cytopathic changes in rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni*: morphology and cytokine release". **Clin Diagn Lab Immunol** 8(4), 837-840.
- Siddiqui, R. y Khan, N.A. (2012) "War of the microbial worlds: who is the beneficiary in *Acanthamoeba*-bacterial interactions?". **Exp Parasitol** 130(4), 311-313.
- Siegel, M.O., Fedorko, D.P., Drake, S.K., Calhoun, L.B. y Holland, S.M. (2010) "*Legionella feeleii* serotype 2 pneumonia in a man with chronic

- lymphocytic leukemia: a challenging diagnosis". **J Clin Microbiol** 48(6), 2294-2297.
- Singh, B. (1952) "Nuclear Division in Nine Species of Small Free-Living Amoebae and Its Bearing on the Classification of the Order Amoebida". **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** 236(636), 405-461.
  - Singhal, T., Bajpai, A., Kalra, V., Kabra, S.K., Samantaray, J.C., Satpathy, G. y Gupta, A.K. (2001) "Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials". **Pediatr Infect Dis J** 20(6), 623-627.
  - Sison, J.P., Kemper, C.A., Loveless, M., McShane, D., Visvesvara, G.S. y Deresinski, S.C. (1995) "Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review". **Clin Infect Dis** 20(5), 1207-1216.
  - Slater, C.A., Sickel, J.Z., Visvesvara, G.S., Pabico, R.C. y Gaspari, A.A. (1994) "Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient". **N Engl J Med** 331(2), 85-87.
  - Solgi, R., Niyiyati, M., Haghghi, A., Taghipour, N., Tabaei, S.J., Eftekhari, M. y Nazemalhosseini Mojarad, E. (2012) "Thermotolerant *Acanthamoeba* spp. isolated from therapeutic hot springs in Northwestern Iran". **J Water Health** 10(4), 650-656.
  - Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P. y Visvesvara, G.S. (2008) "Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years". **J Clin Microbiol** 46(12), 4045-4048.
  - Steenbergen, J.N., Shuman, H.A. y Casadevall, A. (2001) "*Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages". **Proc Natl Acad Sci USA** 98(26), 15245-15250.
  - Steinberg, J.P., Galindo RI Fau - Kraus, E.S., Kraus Es Fau - Ghanem, K.G. y Ghanem, K.G. (2002) "Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review". **Clin Infect Dis**. 35(5), e43-49. Epub 2002 Aug 2002.

- Steinert, M., Emody, L., Amann, R. y Hacker, J. (1997) "Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*". **Appl Environ Microbiol** 63(5), 2047-2053.
- Stewart, G.L., Shupe, K., Kim, I., Silvany, R.E., Alizadeh, H., McCulley, J.P. y Niederkorn, J.Y. (1994) "Antibody-dependent neutrophil-mediated killing of *Acanthamoeba castellanii*". **Int J Parasitol** 24(5), 739-742.
- Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A. y Byers, T.J. (1998) "The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types". **J Eukaryot Microbiol** 45(1), 45-54.
- Tan, B., Weldon-Linne, C.M., Rhone, D.P., Penning, C.L. y Visvesvara, G.S. (1993) "*Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome". **Arch Pathol Lab Med** 117(10), 1043-1046.
- Tanaka, Y., Suguri, S., Harada, M., Hayabara, T., Suzumori, K. y Ohta, N. (1994) "*Acanthamoeba*-specific human T-cell clones isolated from healthy individuals". **Parasitol Res** 80(7), 549-553.
- Tavares, M., Correia da Costa, J.M., Carpenter, S.S., Santos, L.A., Afonso, C., Aguiar, A., Pereira, J., Cardoso, A.I., Schuster, F.L., Yagi, S., Sriram, R. y Visvesvara, G.S. (2006) "Diagnosis of first case of *Balamuthia* amoebic encephalitis in Portugal by immunofluorescence and PCR". **J Clin Microbiol** 44(7), 2660-2663.
- Teknos, T.N., Poulin, M.D., Laruentano, A.M. y Li, K.K. (2000) "*Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment". **Am J Rhinol** 14(6), 387-391.
- Thom, S., Warhurst, D. y Drasar, B.S. (1992) "Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae". **J Med Microbiol** 36(5), 303-306.
- Thomas, J.M. y Ashbolt, N.J. (2011) "Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk?". **Environ Sci Technol** 45(3), 860-869.
- Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M. y Greub, G. (2008) "Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant". **Environ Microbiol** 10(10), 2728-2745.

- Toney, D.M. y Marciano-Cabral, F. (1998) "Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis". **J Parasitol** 84(2), 338-344.
- Trabelsi, H., Sellami, A., Dendena, F., Sellami, H., Cheikh-Rouhou, F., Makni, F., Ben, D.S. y Ayadi, A. (2010) "Free-living Amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water". **Parasite** 17(1), 67-70.
- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M.S. y Müller, N. (2004) "The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria". **Parasitol Res** 92(5), 405-413.
- Van Klink, F., Leher, H., Jager, M.J., Alizadeh, H., Taylor, W. y Niederkorn, J.Y. (1997) "Systemic immune response to *Acanthamoeba* keratitis in the Chinese hamster". **Ocul Immunol Inflamm** 5(4), 235-244.
- Varela Mato, M., Arias Fernandez, M.C., Paniagua Crespo, E. y Martí Mallen, M. (1987) "Aislamiento de amebas de vida libre a partir de aguas embotelladas y manantiales". **Revista Iberica de Parasitología** 47, 105.
- Vemuganti, G.K., Reddy, K., Iftekhhar, G., Garg, P. y Sharma, S. (2004) "Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases". **BMC Ophthalmol** 4, 16.
- Venkataraman, C., Gao, L.Y., Bondada, S. y Kwai, Y.A. (1998) "Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*". **J Exp Med** 188(3), 505-514.
- Villani, E., Baudouin, C., Efron, N., Hamrah, P., Kojima, T., Patel, S.V., Pflugfelder, S.C., Zhivov, A. y Dogru, M. (2014) "In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside". **Curr Eye Res** 39(3), 213-231.
- Visvesvara, G. y Maguire, J. (2006) *Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice*. Vol. 2. RL Guerrant, D.W., PF Weller (ed), pp. 1114-1125, Churchill Livingstone (Elsevier), Philadelphia.
- Visvesvara, G.S., Mirra, S.S., Brandt, F.H., Moss, D.M., Mathews, H.M. y Martínez, A.J. (1983) "Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii*

- from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles". **J. Clin. Microbiol.** 18(6), 1405-1412.
- Visvesvara, G.S. (1991) "Classification of *Acanthamoeba*". **Rev Infect Dis** 13 Suppl 5, S369-372.
  - Visvesvara, G.S., Booton, G.C., Kelley, D.J., Fuerst, P., Sriram, R., Finkelstein, A. y Garner, M.M. (2007a) "In vitro culture, serologic and molecular analysis of *Acanthamoeba* isolated from the liver of a keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*)". **Vet Parasitol** 143(1), 74-78.
  - Visvesvara, G.S., Moura, H. y Schuster, F.L. (2007b) "Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*". **FEMS Immunol Med Microbiol** 50(1), 1-26.
  - Visvesvara, G.S. (2010) "Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment". **Curr Opin Infect Dis** 23(6), 590-594.
  - Visvesvara, G.S., Shoff, M.E., Sriram, R., Booton, G.C., Crary, M., Fuerst, P.A., Hanley, C.S. y Garner, M.M. (2010) "Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*)". **Vet Parasitol** 170(3-4), 197-200.
  - Visvesvara, G.S. (2013) "Infections with free-living amoebae". **Handb Clin Neurol** 114, 153-168.
  - Volkonsky, M. (1931) "*Hartmannella castellani* Douglas, et classification des hartmannelles". **Arch Zool Exp Gen** 72, 317-339.
  - Walochnik, J., Picher, O., Aspöck, C., Ullmann, M., Sommer, R. y Aspöck, H. (1998) "Interactions of "Limax amoebae" and gram-negative bacteria: experimental studies and review of current problems". **Tokai J Exp Clin Med** 23(6), 273-278.
  - Walochnik, J., Hassl, A., Simon, K., Benyr, G. y Aspöck, H. (1999) "Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae)". **Parasitol Res** 85(7), 601-603.
  - Walochnik, J., Duchene, M., Seifert, K., Obwaller, A., Hottkowitz, T., Wiedermann, G., Eibl, H. y Aspöck, H. (2002) "Cytotoxic activities of

- alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp". **Antimicrob Agents Chemother** 46(3), 695-701.
- Walochnik, J., Aichelburg, A., Assadian, O., Steuer, A., Visvesvara, G., Vetter, N. y Aspöck, H. (2008) "Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient". **J Clin Microbiol** 46(1), 338-340.
  - Wang, X. y Ahearn, D.G. (1997) "Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*". **Curr Microbiol** 34(4), 212-215.
  - Weekers, P.H., Bodelier, P.L., Wijen, J.P. y Vogels, G.D. (1993) "Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria". **Appl Environ Microbiol** 59(7), 2317-2319.
  - Westmoreland, S.V., Rosen, J., MacKey, J., Romsey, C., Xia, D.L., Visvesvera, G.S. y Mansfield, K.G. (2004) "Necrotizing meningoencephalitis and pneumonitis in a simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque due to *Acanthamoeba*". **Vet Pathol** 41(4), 398-404.
  - Willaert, E. y Stevens, A.R. (1976) "Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis". **Pathol Biol (Paris)** 24(8).
  - Yang, H.W., Lee, Y.R., Inoue, N., Jha, B.K., Danne, D.B., Kim, H.K., Lee, J., Goo, Y.K., Kong, H.H., Chung, D.I. y Hong, Y. (2013) "Loop-mediated isothermal amplification targeting 18S ribosomal DNA for rapid detection of *Acanthamoeba*". **Korean J Parasitol** 51(3), 269-277.
  - Yang, Q., Zwick, M.G. y Paule, M.R. (1994) "Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers". **Nucleic Acids Res** 22(22), 4798-4805.
  - Yousuf, F.A., Siddiqui, R. y Khan, N.A. (2013a) "*Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*". **Parasit Vectors** 6, 169.
  - Yousuf, F.A., Siddiqui, R., Subhani, F. y Khan, N.A. (2013b) "Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan". **J Water Health** 11(2), 371-375.

- Zhang, X., Sun, X., Jiang, C., Wang, Z., Zhang, Y., Deng, S. y Labbe, A. (2014) "A new in vivo confocal microscopy prognostic factor in *Acanthamoeba keratitis*". **J Fr Ophtalmol** 37(2), 130-137.

