

**Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias
(IUETSPC)**

**Departamento de Obstetricia y Ginecología. Pediatría, Medicina Preventiva,
Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología
(Área de Parasitología)**

TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE AMEBAS DE
VIDA LIBRE
EN VENEZUELA**



Doctoranda: Lcda./Msc. Doña Carolina Mercedes Wagner Abuchaibe

Directores de tesis:

Dr. D. Jacob Lorenzo Morales

Dr. D. Basilio Valladares Hernández

Dr. D. Enrique Martínez Carretero

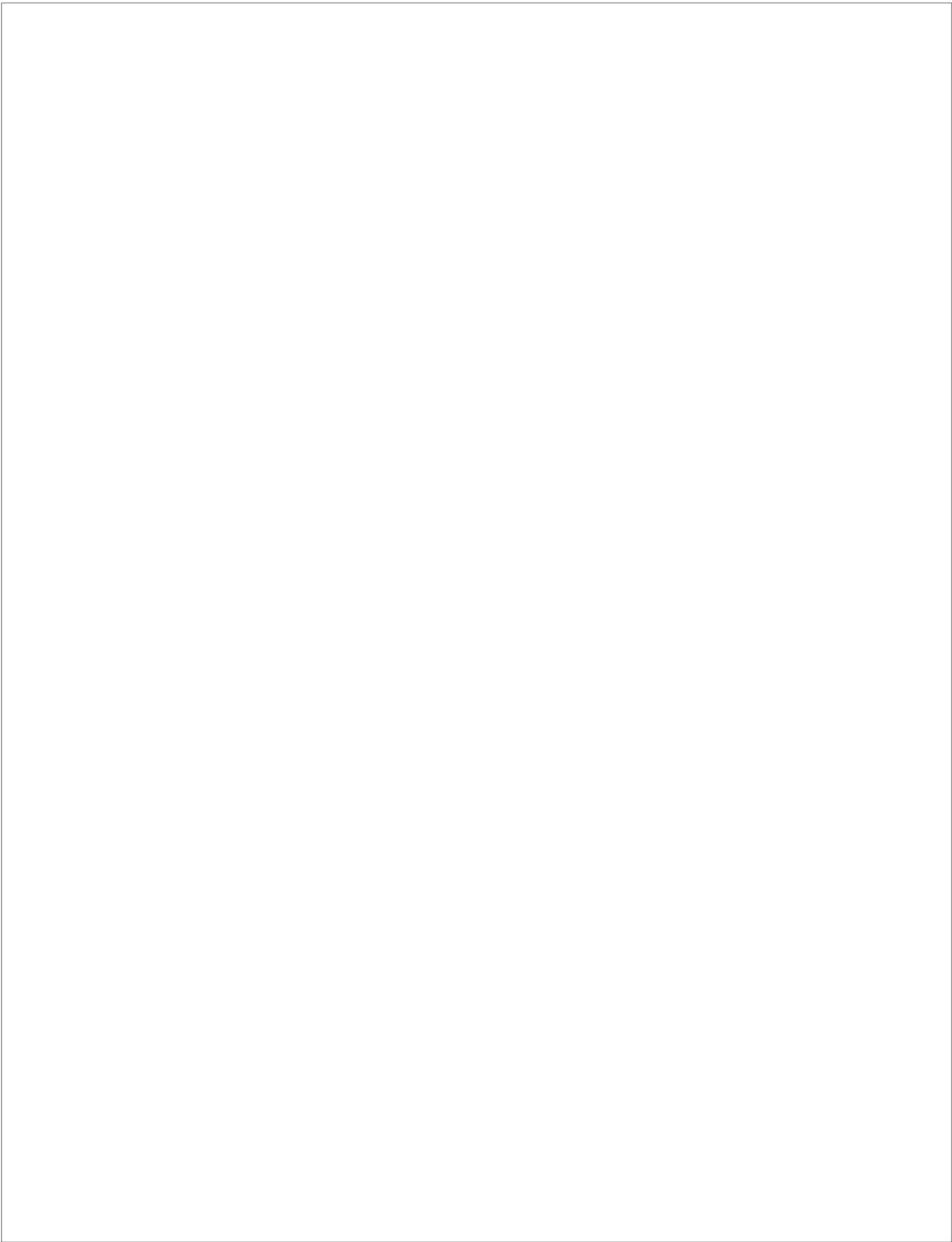
San Cristóbal de La Laguna, Mayo 2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

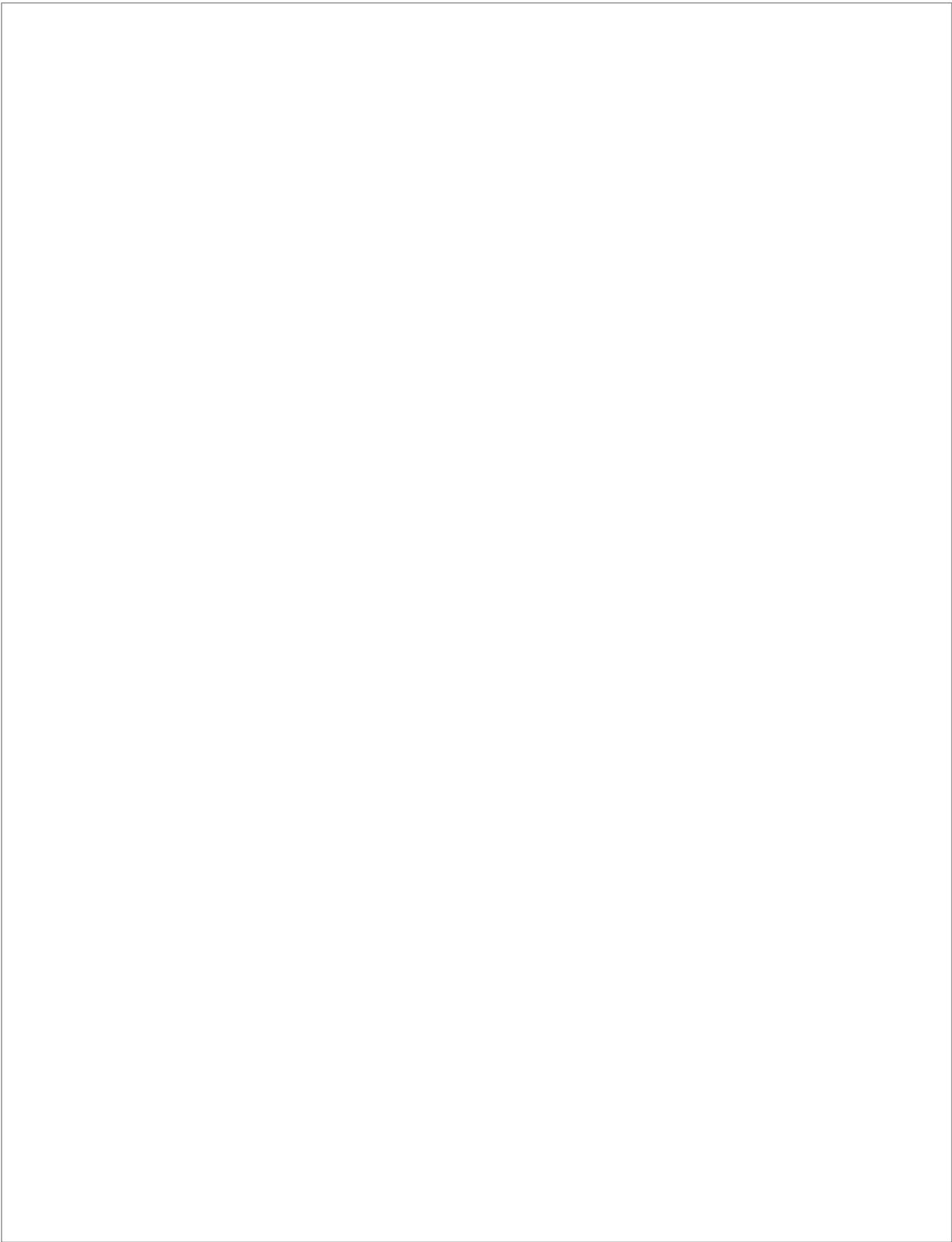


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias
(IUEETSPC)

Departamento de Obstetricia y Ginecología. Pediatría, Medicina Preventiva,
Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología
(Área de Parasitología)

TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA LIBRE
EN VENEZUELA**

Doctoranda: Lcda./Msc. Doña Carolina Mercedes Wagner Abuchaibe

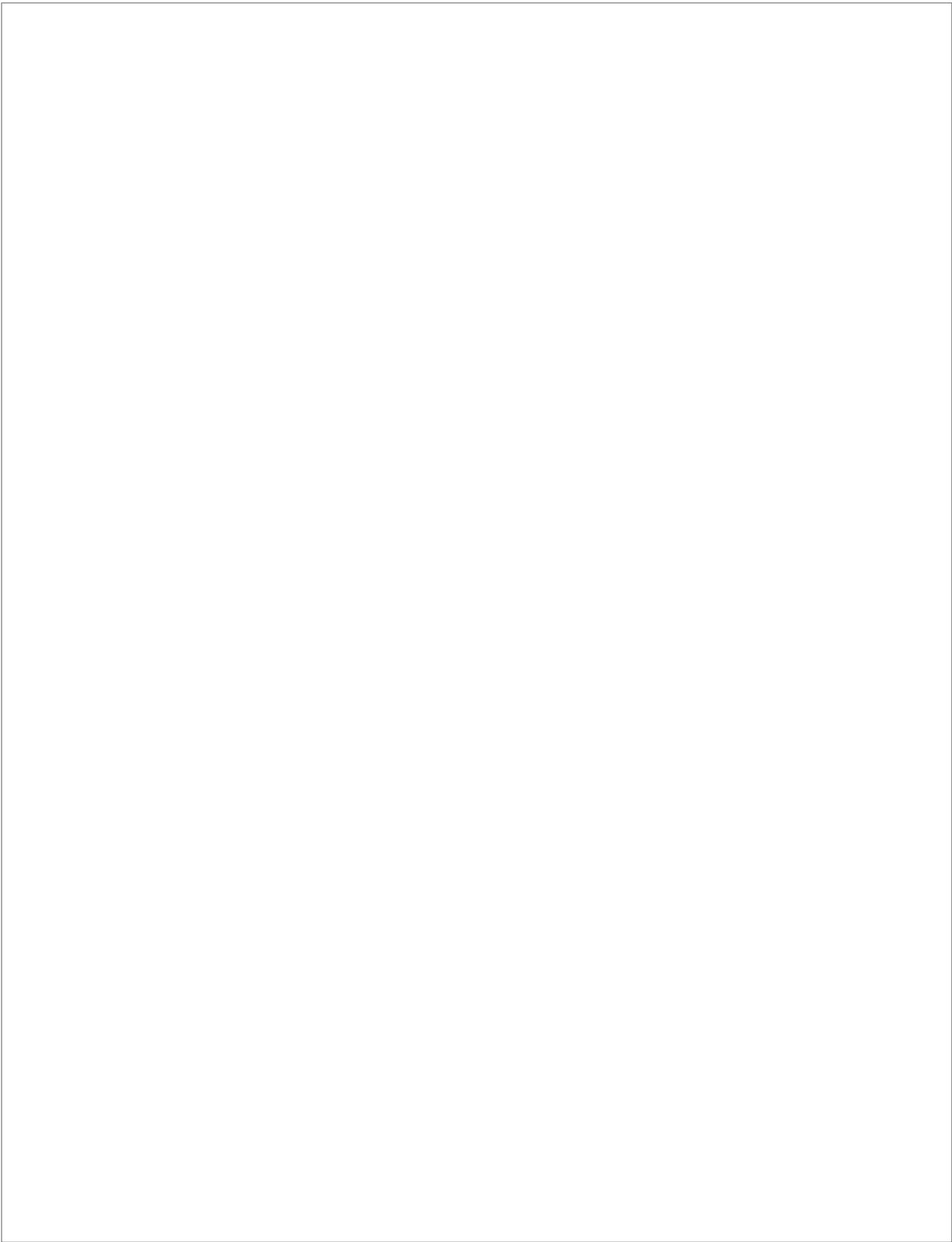
San Cristóbal de La Laguna, Mayo 2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

D. JACOB LORENZO MORALES, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR TIPO 1 DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, D. BASILIO VALLADARES HERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO Y D. ENRIQUE MARTÍNEZ CARRETERO, PROFESOR TITULAR, ÁREA DE PARASITOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada *“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN VENEZUELA”* ha sido realizada bajo su dirección y consideran que la misma reúne las condiciones de calidad y rigor científico para que pueda ser presentada y defendida ante la comisión nombrada al efecto.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos para el inicio de los trámites de su presentación, emitimos un informe FAVORABLE.

En La Laguna, a 5 de Mayo de 2017.

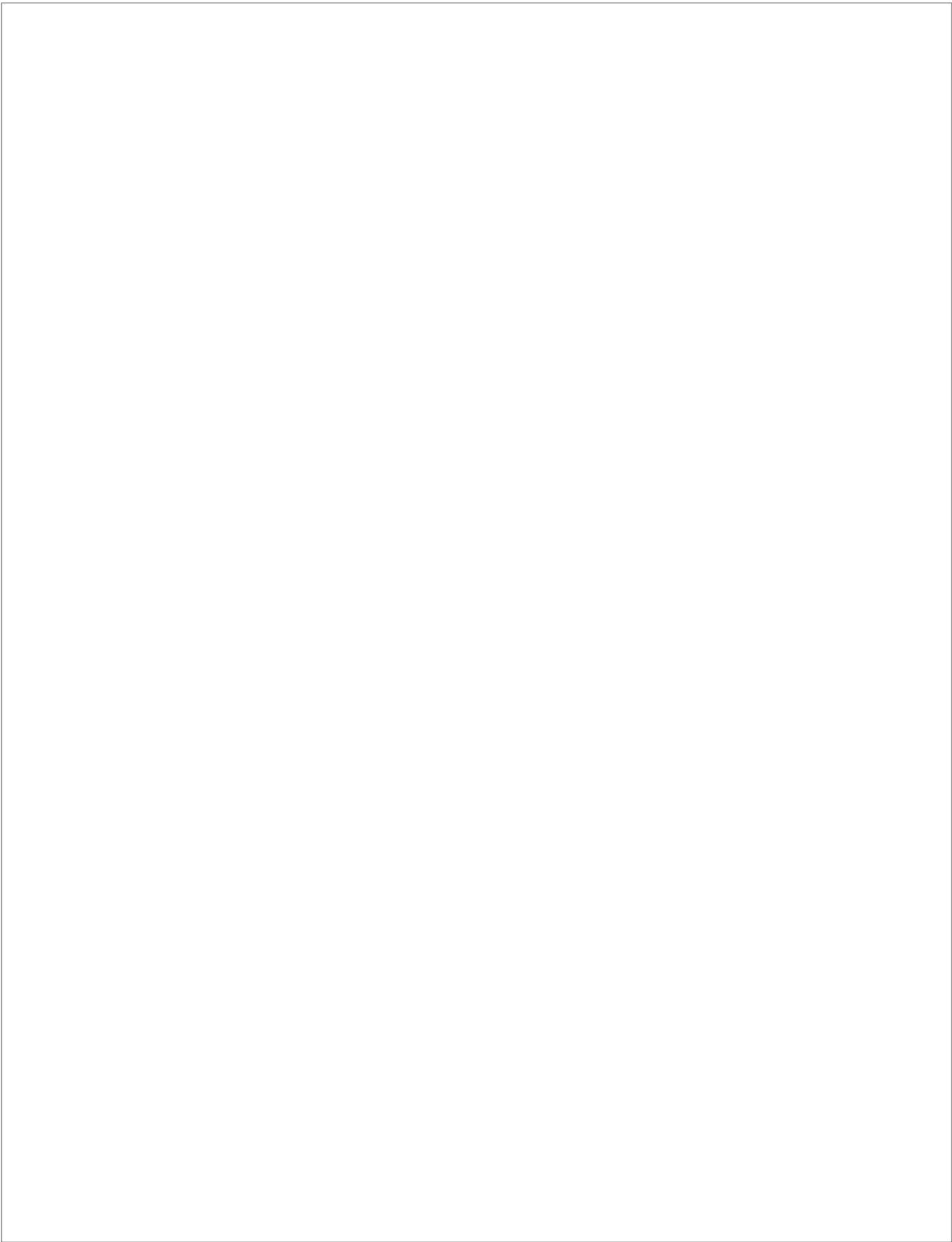
Fdo. Dr. D. Jacob Lorenzo Morales

Fdo. Dr. D. Basilio Valladares Hernández

Fdo. Dr. D. Enrique Martínez Carretero

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

DEDICATORIA

A mi amada **VENEZUELA**: no sabes cuánto añoro tu grandiosa e imponente geografía y a tu gente maravillosa. Cuida mi hogar y en él a los míos mientras vuelvo, para reconstruirte con amor y trabajo y así devolverte la prosperidad, la paz y la armonía que unos cuantos sin alma te han robado... **"LLEVO TU LUZ Y TU AROMA EN MI PIEL".... FUERZA Y FE, MI PATRIA QUERIDA.**

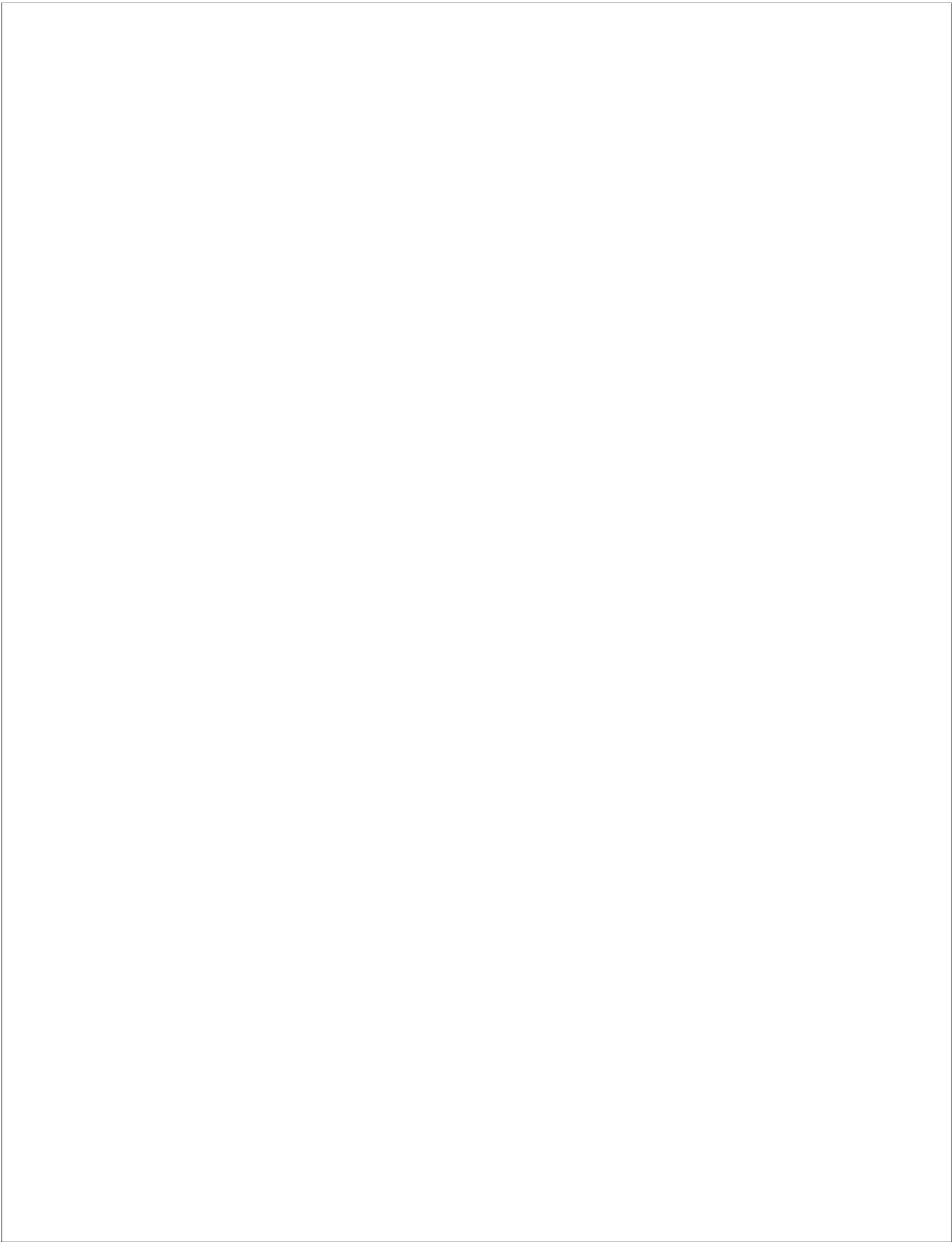
A l@s guerrer@os de la vida, valientes seres que todos llevamos por dentro... **SI SE PUEDE!!!**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento o gratitud es una actitud de reconocimiento por algún beneficio, gesto o favor recibido, en circunstancias particulares, buenas o malas, hacia todos aquellos que comparten vivencias con nosotros. Al agradecer, se recuerda con emoción positiva, la amabilidad del gesto del otro, más que el favor o servicio recibido. Para expresar agradecimiento, puede hacerse con una simple sonrisa, una nota escrita o de voz, un abrazo, un regalo y unas cuantas formas más, tales como las oraciones elevadas a quienes ya no están físicamente en este mundo.

La ejecución de una tesis no escapa a la expresión máxima de dicha actitud, porque en definitiva, aunque una tesis tenga uno o más autores, siempre participan deidades, unas cuantas personas en físico y de manera espiritual, instituciones e incluso un país entero, para lograr el gran resultado final.

Esta tesis en especial tiene un matiz muy particular, porque de una u otra forma, pudo ser final y exitosamente concluida por el apoyo de incontables sonrisas, abrazos, palabras, oraciones, aportes de tipo monetario y de otras índoles, para sobrellevar la difícil situación de mi estadía en España y además, por la lucha librada y ganada a un inesperado cáncer, el cual, junto a la distancia física que me separa de aquellos que amo, me enseñó a valorar aún más lo que tengo, a agradecer cada amanecer y cada anochecer; a disfrutar y tomar lo positivo de cada minuto de vida que transcurre y a conocer lo fuerte que se puede ser cuando de vivir se trata. Esa misma fuerza de vida también me impulsó a lograr los objetivos de la tesis.

Y así mis palabras de gratitud se liberan de mi corazón para quedar escritas a continuación:

A Dios, a la Virgen María y a mis ángeles de la guarda espirituales y terrenales (que son bastantes), por el gran regalo de la VIDA, por cada día y cada noche que me concedieron, en los cuales siempre encontré oportunidades y bendiciones para afrontar las dificultades, aprender y ser mejor persona. Y a los que no están ya en esta tierra y que sé me acompañan como ángeles de la guarda, incluyendo a Bono... los he sentido cuidándome y dándome la fuerza que tanto necesité en los momentos más duros.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

A mi familia maravillosa: mis viejitos, mis padres adorados, quienes desde la lejanía me enseñaron que el amor paternal es incondicional y puede cruzar océanos, llegando engrandecido, para sostenerme al flaquear o mantenerme fuerte, siempre que lo he necesitado. Los amooooo; Tía Rosita y Tía Clementina, las incluyo en este agradecimiento de “viejitos” especiales. Mis hermanas de sangre y de alma (Mary, Ale, Aurorita, Elsy), sobrinos (Gabo, Tefa, Faby, Chowi, Vani y Alejandro), cuñados, primos...un ser humano no está completo si no tiene a su familia apoyándolo en las buenas y en las malas. Me demostraron que la distancia no existe para el alma y el corazón. Mary y Faby, gracias por venir a cuidarme en nombre de tod@s, nunca olvidaré las “Wagner” aventuras en Tenerife.

A mi familia escogida, l@s amig@s... afortunada de haber conocido a gente maravillosa en el transcurso de mi vida, se me queda la tesis corta para nombrarl@s a tod@s. Y lo más grandioso es que están por doquier, por la razón que sea: Venezuela, Canadá, U.S.A, México, Colombia, Costa Rica, Argentina, Perú, Chile, España, Túnez...¿qué más puedo pedir?... son un gran regalo de la vida. Cada un@ de Uds. con sus mensajes, llamadas y mil detalles más, lograron mantenerme firme, con fuerza y convencida de que SI SE PUEDE.

A la “casa que vence la sombra”, mi Universidad Central de Venezuela (UCV): donde conseguí en la Escuela de Bioanálisis un segundo hogar, además de prepararme para ejercer mi profesión con excelencia y no conforme, para enseñarla con amor y principios, como un legado del Sabio Dr. Rafael Rangel, nuestro padre del Bioanálisis y de la Parasitología en Venezuela; también allí he vivido y aprendido el valor del pensamiento y de las ideas, el respeto y confraternidad. Para ti, mi UCV, estoy aquí, terminando este objetivo trazado, a pesar de “la tormenta” y así ofrecerte el fruto de mi esfuerzo.

A mis hermanas y maestras “parasitólogas”: Eva, María Virginia, Carmen, Anaibeth, Mónica, Angelyseb, María Alejandra. Debo agradecer todo la paciencia y el apoyo que me han brindado siempre en estos 19 años; sin Uds., tampoco hubiera logrado llegar hasta aquí. Han sido mi inspiración y un gran ejemplo de mística de trabajo, solidaridad y amistad. Vayan estas palabras también a Yanitza, Ely y a todos los profes amigos y a los estudiantes de mi Escuela querida, así como a mi gente del Instituto de Medicina Tropical-UCV, en especial a mis siempre admirados y queridos Dres. Oscar y Belkisyolé, gracias por la confianza y por creer en mí desde que inicie, de sus manos, este camino “parasitológico”.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

A la Universidad de La Laguna, por mostrar solidaridad con mi situación con las ayudas aportadas y por permitirme tener el mejor lugar posible para recuperarme y así concluir mi doctorado: cuando me refiero al Colegio Mayor San Agustín, no solo lo hago por el espacio físico, sino por todas las personas muy especiales que allí laboran y convivieron conmigo mientras estuve allí: personal administrativo (Luisa, Dácil, Paco, Oscar) de cocina (Otto, Mary Carmen, Nieves), de vigilancia (Ana, Maribel, Emilio), de limpieza, de dirección de estudiantes y alumnado con el que compartí este año y medio, todos de gran calidad humana...gracias de todo corazón.

Al Dr. Jacob Lorenzo Morales, mi director de tesis, quien me permitió formar parte de un gran EQUIPO de trabajo que hace vida en el Laboratorio de Amebas de Vida Libre en el IUETSPC y además compartió día a día su gran talento y amplia experiencia. Es admirable tu mística de trabajo y los aportes innumerables que haces al estudio de las AVL en el mundo. No en vano el Laboratorio parece la O.N.U. Eres una gran persona en todo sentido, gracias por todo lo que me has enseñado y ayudado durante mi estadía en el Laboratorio y en Tenerife, ha sido más que un honor y un inmenso privilegio trabajar contigo y tu grupo: gracias, gracias y más gracias.

A mis directores de tesis, Dres. Basilio Valladares y Enrique Martínez Carretero, por abrirme las puertas para realizar este doctorado y por darme su apoyo tanto personal como académico para llegar a la meta. Ha sido una de las más gratas experiencias en mi vida el haber venido a esta ilustre Universidad y a este prestigioso Instituto para crecer como profesional. Basilio, eres un ser admirable, mucho que aprender de ti y de tu gran trayectoria y don de gente.

Al Dr. José Piñero y a las “chicas súper poderosas” del Laboratorio: Atteneri, María, Inés, Carmen...me encontré a las mejores personas e investigadoras en un solo lugar: el Laboratorio de Amebas de Vida Libre, eso si que es tener suerte!!. Gracias por hacerme sentir como en casa, compartir conocimientos y experiencia y por cuidarme durante todo este tiempo. También agradezco a los que han compartido conmigo en el Laboratorio: Salma, Soumaya, Olfa, Alexis, Alejandro, Jona, Daniel, Jonathan, Hamza, Imad, Nuno, Ana, Aytor, Carlos y a los de fuera del Labo.: Javier y Pedro.

A todo el personal docente/investigación y administrativo del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, por su apoyo académico y personal constante desde mi llegada y en especial, durante mis momentos difíciles.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Al gobierno de Canarias, al Servicio Canario de Salud y al Ayuntamiento de La Laguna, por el apoyo económico otorgado necesario para recuperar mi salud. Y en lo personal, Rosa Martin, para ti un aparte especial, eres magnífica!!! y ni hablar, Rosario Rodríguez, el ángel palmero.

A todas las ONG que me han aportado asistencia para poder mantenerme en Tenerife y que con sus distintos servicios, me permitieron superar la prueba de vida y por ende, terminar esta tesis: AMATE (Asociación de Cáncer de mama de Tenerife: Asun, Isabel, Nayra, Virginia, Alexandra, Raquel, Carolina, Vanesa, Ipsy, Ludmila, Maribel, Carlos, Sandra, Josy); AECC (Asociación Española contra el Cáncer: Yolanda, Lucía, Raquel) y Cruz Roja Española (Meme, Jesica, Alberto, Yanira). Gracias a tod@s por darle una cara amable y solidaria a cada una de sus instituciones.

*“Lo que hagas sin esfuerzo y con
presteza, durar no puede ni tener
belleza”.*

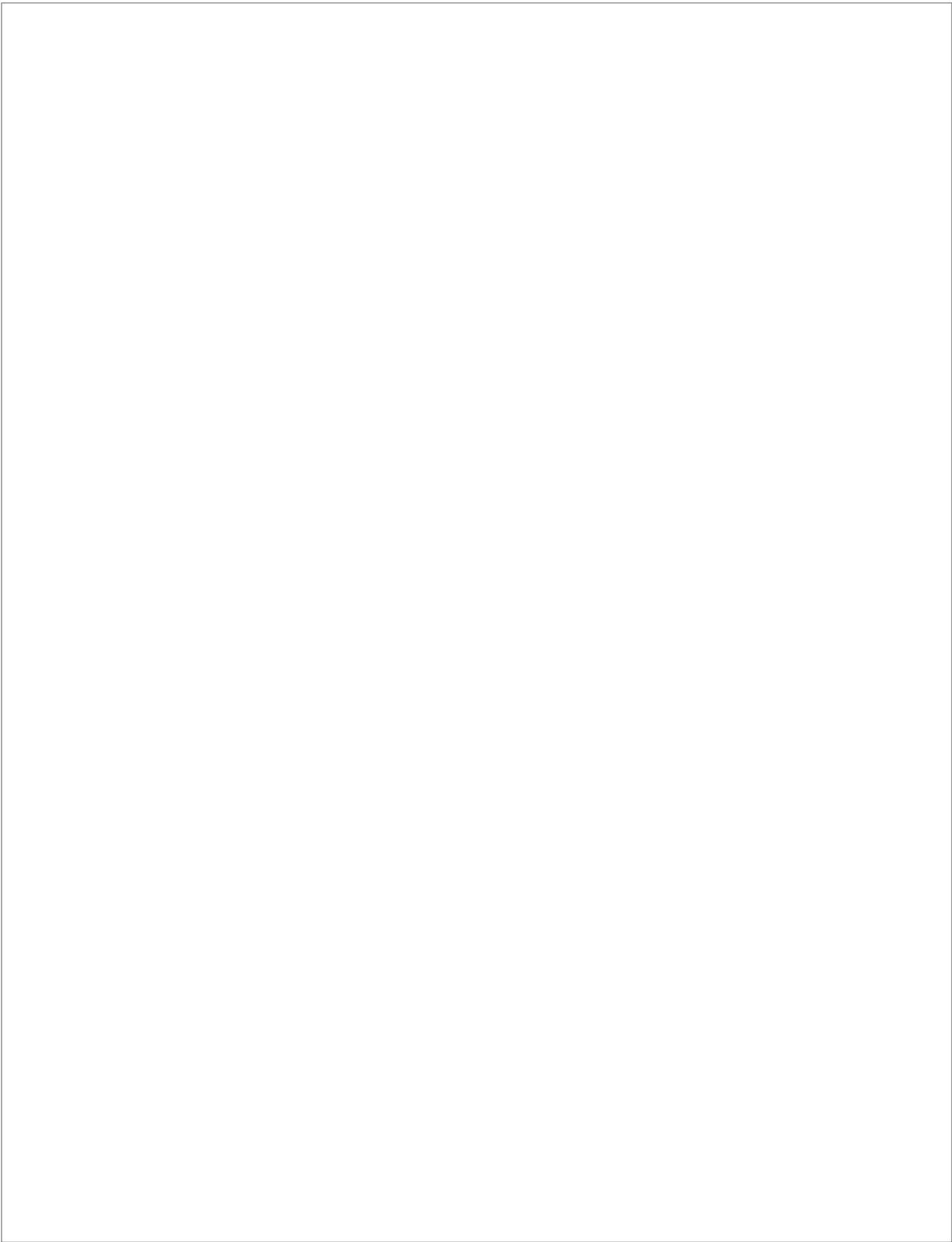
Plutarco

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por:

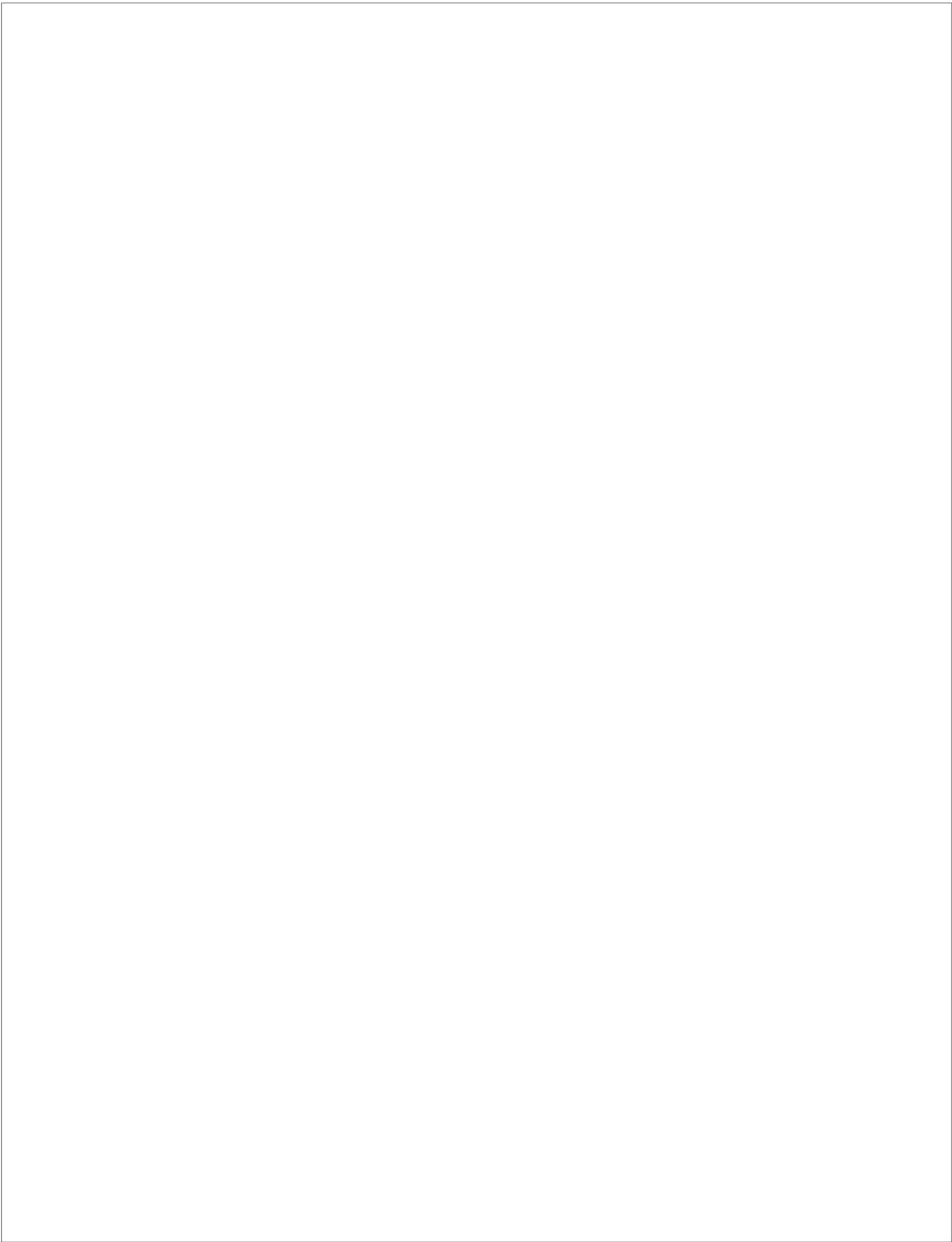
- Proyecto Amebas de vida libre como marcadores de calidad de agua (Ref: AGUA3).
- Beca sueldo exterior para profesores, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. (2014-2015, 2015-2016, 2016-2017).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

Contenido

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Introducción al tema.	11
2. Taxonomía general y nomenclatura de las amebas de vida libre.	12
3. Morfología general y ciclo de vida de las amebas de vida libre.	15
3.1 Estructura celular.	16
3.2 Biología de las AVL.	20
4. Amebas de vida libre patógenas.	23
4.1 Género <i>Acanthamoeba</i>	23
4.1.1 Generalidades.	23
4.1.2 Morfología	24
4.1.3 Ciclo de vida y biología.	25
4.2 Género <i>Naegleria</i> . <i>Naegleria fowleri</i> .	28
4.2.1 Generalidades.	28
4.2.2 Morfología.	29
4.2.3 Ciclo de vida y biología.	30
4.3 Género <i>Balamuthia</i> : <i>Balamuthia mandrillaris</i> .	32
4.3.1 Generalidades	32
4.3.2 Morfología.	33
4.3.3 Ciclo de vida y biología.	34
4.4 Género <i>Sappinia</i> .	36
4.4.1 Generalidades	36
4.4.2 Morfología.	37
4.4.3 Ciclo de vida y biología.	38
4.5 Otras amebas de importancia en salud pública: <i>Vermamoeba vermiformis</i> , <i>Vahlkampfia</i> y <i>Paravahlkampfia</i> .	39
5. Enfermedades producidas por amebas de vida libre.	44

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

5.1 Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP): clínica, epidemiología y diagnóstico.	46
5.2 Encefalitis granulomatosa amebiana por <i>Acanthamoeba</i> , <i>Balamuthia</i> y <i>Sappinia</i> : clínica, epidemiología y diagnóstico.	51
5.3 Queratitis amebiana, queratoconjuntivitis y úlceras corneales: clínica, epidemiología y diagnóstico.	57
5.4 Lesiones cutáneas por <i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>B. mandrillaris</i> : clínica, epidemiología y diagnóstico.	61
6. Tratamiento de las infecciones por Amebas de Vida Libre.	63
7. Las Amebas de Vida Libre en Venezuela.	66
7.1 Estado actual del tema. Hipótesis.	70
OBJETIVOS	75
MATERIAL Y METODOS	79
1. Material.	79
1.1. Soluciones, reactivos y tampones.	79
1.2. Medios de cultivo.	79
1.3. Equipamiento.	81
1.4. Otros materiales	81
1.5. Software.	82
2. Aislamiento y cultivo de AVL a partir de muestras ambientales.	82
2.1. Elección de las zonas de muestreo.	82
2.2. Toma de muestras	86
2.3. Siembra de muestras en placas de ANN	87
2.4. Aislamiento de AVL	87
2.5. Extracción de ADN genómico	87
2.6. Identificación mediante PCR	88
2.7. Genotipado de los aislados	90
2.8. Caracterización del potencial patogénico de las cepas axénicas: Osmotolerancia y Termotolerancia.	91
3. Aislamiento y cultivo de AVL a partir de muestras clínicas.	91
3.1. Selección de las muestras.	91

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

3.2. Procesamiento de las muestras.	92
4. Evaluación de LCR y muestras de agua para la identificación de <i>N. fowleri</i> en un caso fatal de MAP.	93
4.1 Obtención de las muestras	93
4.2 Procesamiento de las muestras.	94
ARTICULOS PUBLICADOS	99
RESUMEN DE ARTICULOS.	100
Artículo 1: High occurrence of <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 in soil sources from Bolívar State, Venezuela. <i>Acta Parasitologica</i> . 2016, 61(3):466-470.	100
Artículo 2: Genotyping of clinical isolates of <i>Acanthamoeba</i> genus in Venezuela. <i>Acta Parasitologica</i> . 2016, 61(4):796-801.	107
Artículo 3: Isolation of <i>Naegleria fowleri</i> from a domestic water tank associated with a fatal encephalitis in a 4 month-old Venezuelan child. <i>Tropical Biomedicine</i> , 2017, 34(2): 1–6.	115
CONCLUSIONES	125
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	129
ANEXOS	161

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

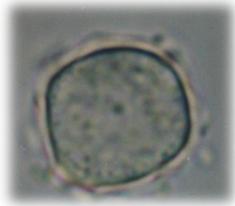


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25



ABREVIATURAS

La ciencia no tiene patria.

Louis Pasteur.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

ABREVIATURAS

ANN: Agar no nutritivo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

ATCC: *American Type Culture Collection* (Colección de cultivo- tipo Americanos).

AVL: Amebas de vida libre.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta).

DF3: *Diagnostic Fragment 3* (fragmento de diagnóstico 3).

EGA: Encefalitis Granulomatosa Amebiana.

g: Gramos

MAP: Meningoencefalitis Amebiana Primaria.

ml: Mililitro.

PAS: *Page's Amoeba Saline Solution* (solución salina de Page para amebas).

pb: Pares de bases.

PCR: *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

QA: Queratitis por *Acanthamoeba*.

SNC: Sistema nervioso central.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

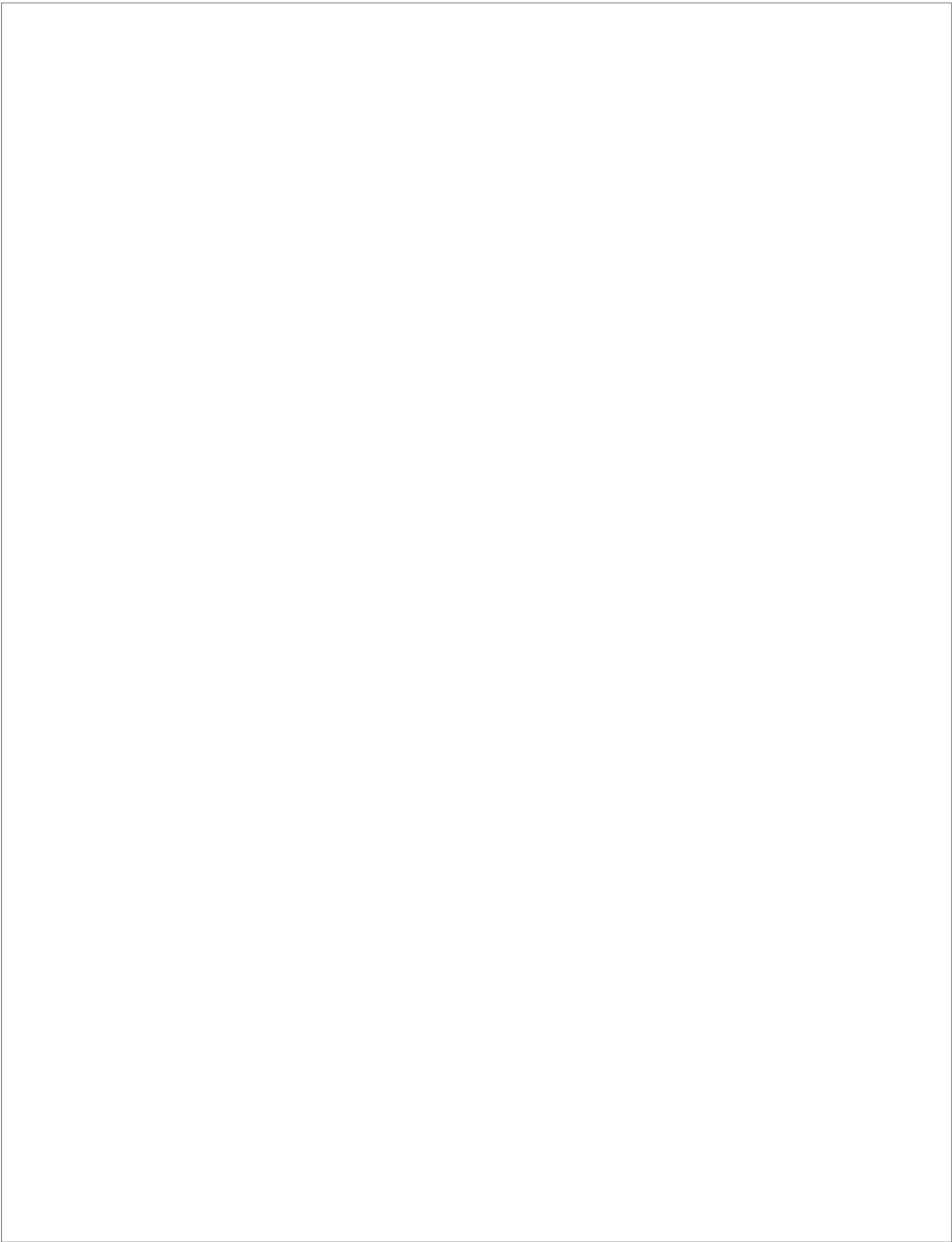
µm: Micrómetros.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25



RESUMEN

La ciencia no conoce su deuda a la imaginación.

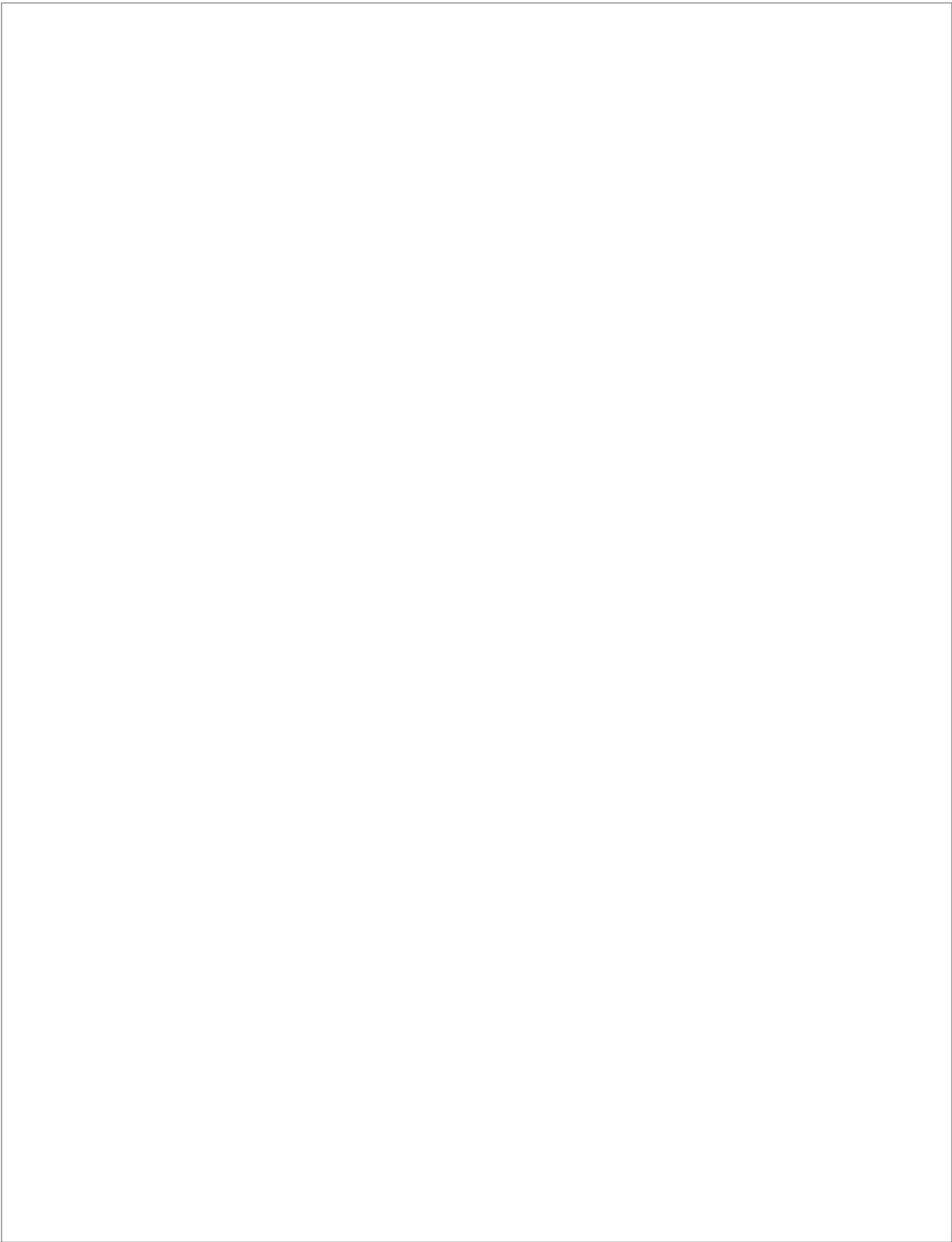
Ralph Waldo Emerson

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos parásitos facultativos, ubicuos, que pueden generar en el humano y otros hospedadores, enfermedades de baja frecuencia pero de gran importancia clínica, tales como la meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis granulomatosa amebiana, queratitis, úlceras corneales, lesiones granulomatosas en piel y otros órganos, además de ser hospedadores para organismos infecciosos de importancia en salud pública humana (bacterias, hongos y virus). Su diagnóstico preciso y precoz es imprescindible para la aplicación de tratamiento adecuado, pero se complica por la falta de experticia y experiencia del personal médico en la mayoría de los centros de salud en todo mundo, lo cual, incide sobre la estimación de la verdadera prevalencia de estas infecciones. Si bien hay algunos reportes en la literatura mundial sobre casos humanos y estudios ambientales, en Venezuela, no se conoce bien la epidemiología de las infecciones por AVL. En la Universidad Central de Venezuela, el Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología/ Escuela de Bioanálisis/ Facultad de Medicina, ha llevado a cabo el diagnóstico y diversas investigaciones sobre estas amebas desde 1984 y con la finalidad de obtener más datos sobre las AVL en este país, se planteó la realización de esta tesis doctoral en el Laboratorio de Amebas de Vida Libre del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias-Universidad de La Laguna. Se logró por primera vez para Venezuela, el genotipado de aislados de *Acanthamoeba* spp. provenientes de muestras clínicas, así como la identificación de este género y sus genotipos en muestras ambientales (suelos) del estado Bolívar (región turística de Venezuela y de asiento de etnias indígenas), mediante la amplificación del gen para el ADN_r 18S por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y su posterior secuenciación. Se definió que el genotipo T4 de *Acanthamoeba* spp fue el predominante, tanto en las muestras

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Resumen

clínicas como en las del suelo del Edo. Bolívar, informado como el mayormente implicado en patologías humanas y animales. Para el caso de un paciente que falleció por una meningoencefalitis amebiana primaria ocasionada por *Naegleria fowleri*, se logró confirmar la fuente de infección al comparar el ADN de los aislados provenientes del líquido cefalorraquídeo y del agua del tanque donde residía el paciente, evaluado por PCR y posterior secuenciación. Con los resultados obtenidos en esta tesis, la literatura sobre AVL en Venezuela se ha ampliado y permitirá a diferentes instituciones de investigación y de salud local e internacional, tener acceso a esta importante información en relación con estos organismos potencialmente patógenos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Fecha: 25/05/2017 11:46:38

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

JACOB LORENZO MORALES
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

25/05/2017 12:40:27

ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

25/05/2017 15:53:39

BASILIO VALLADARES HERNANDEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

26/05/2017 10:35:13

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

01/06/2017 13:54:25



INTRODUCCION

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”

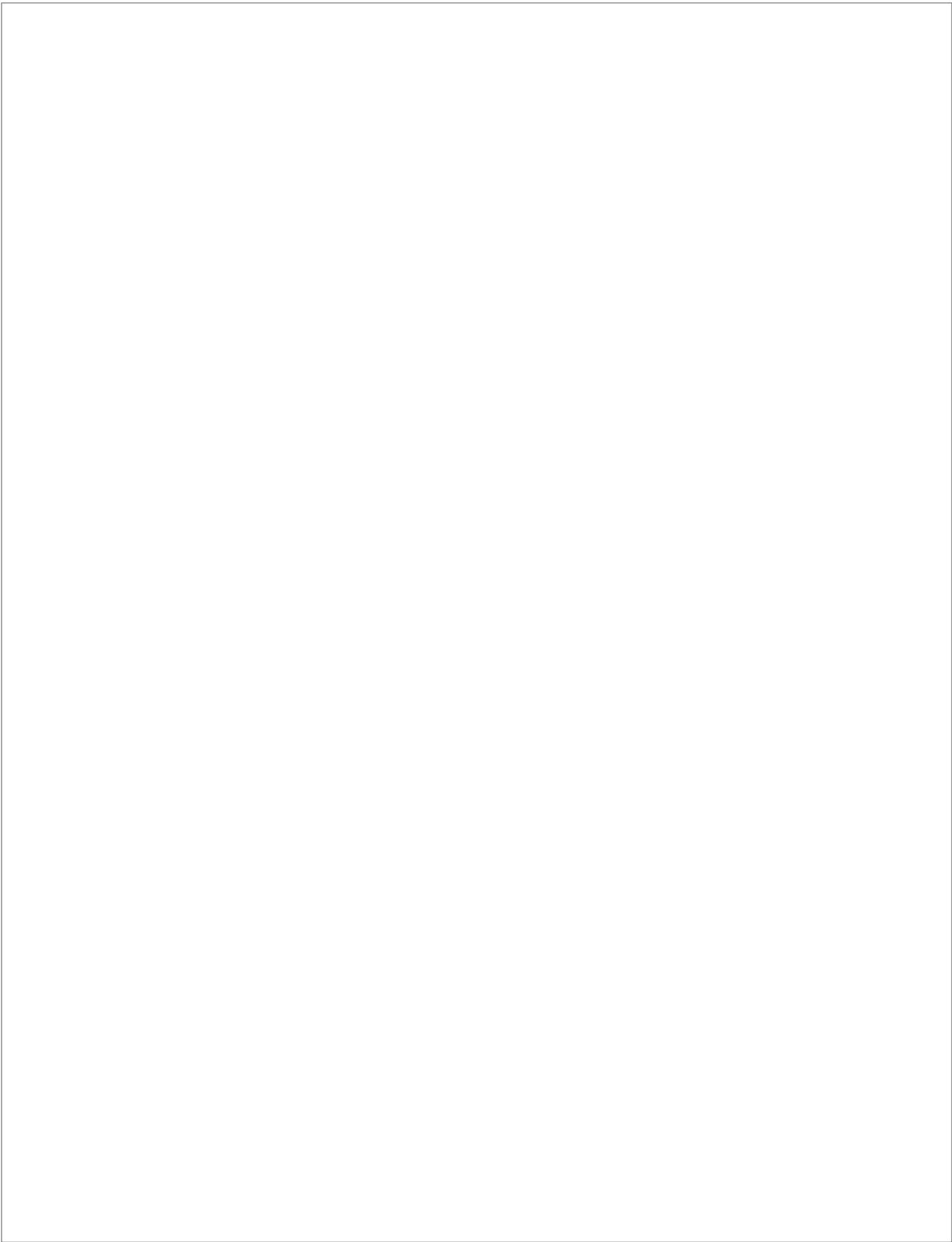
Carl Sagan

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

INTRODUCCIÓN

1. Introducción al tema.

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos distribuidos por todo el mundo, en diversos ambientes de la naturaleza; se han aislado en suelos, aire, aguas de diversas fuentes, así como en superficies de materiales de uso cotidiano, entre otras procedencias. Ocasionalmente, estos organismos pueden infectar a humanos y animales, ocasionándoles patologías diversas, por lo cual se definen como amebas anfitriónicas (Page, 1988).

Se han descrito hasta ahora, gran cantidad de géneros y especies de AVL, pero sólo algunas especies (genotipos) de *Acanthamoeba* spp., las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y *Vermamoeba vermiformis*, junto a los géneros *Paravahlkampfia* y *Vahlkampfia*, han sido reportados como causantes de patologías en humanos y otros animales (Visvesvara *et al.*, 1990; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Visvesvara *et al.*, 2007; Trabelsi *et al.*, 2012,2016).

Las enfermedades producidas por las AVL se han descrito en la literatura desde 1948, cuando se comunicó el caso de un soldado japonés de 22 años, cerca de Buna, Nueva Guinea, el cual falleció siete semanas más tarde debido a una infección amebiana (Derrick, 1948). En 1958, Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba* spp. y para 1965, gracias a los trabajos de Fowler y Carter, se describieron los primeros casos de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) por *Naegleria fowleri*. Las características de la enfermedad producidas por estas amebas sólo han sido reconocidas durante los últimos 50 años, ya que el número de humanos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

infectados por AVL es bajo, comparado con otras enfermedades parasitarias producidas por otros protozoos como *Entamoeba histolytica* (Oddó, 2006).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, Estados Unidos de América) ha definido a las AVL como protozoos emergentes, debido a que producen en el humano, enfermedades de curso diverso, desde cuadros agudos y fatales con predominio necrótico, como la (MAP) causada por *Naegleria fowleri*, hasta una enfermedad crónica con reacción inflamatoria granulomatosa, ocasionada principalmente por amebas del género *Acanthamoeba* y las especies *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata*, en diferentes localizaciones tisulares. Todas estas patologías dependen, de acuerdo a cada caso, de factores de riesgo por parte del hospedador, que pueden predisponer en menor o mayor frecuencia a las infecciones por estos organismos (inmunosupresión, exposición al ambiente, actividades o costumbres culturales, entre otros), por lo cual también se les considera parásitos oportunistas (Page, 1988; Schuster y Visvesvara, 2004-a; Visvesvara *et al.*, 2007; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

En resumen, las AVL son consideradas como agentes infecciosos emergentes, tanto patógenos primarios como oportunistas, cuyo diagnóstico resulta muy complicado desde el punto de vista clínico-patológico y microbiológico, lo cual dificulta a su vez, el establecimiento de la prevalencia real de estas parasitosis.

2. Taxonomía general y nomenclatura de las amebas de vida libre.

La palabra ameba se deriva del latín científico *amoeba* y éste del griego ἀμοιβή amoibé, que significa "cambio", al referirse a la transformación morfológica observada en estos organismos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Introducción

al moverse (Real Academia Española, 2016-a). El grupo de los protistas ameboides comprenden un grupo extenso y muy diverso, con más de 15.000 especies descritas (Adl *et al.*, 2012).

Clásicamente, el sistema para la clasificación de las AVL seguía el protocolo indicado por Page en 1988, fundamentado en la propuesta por este mismo autor en 1987 (Page, 1987, 1988). Esta clasificación (Figura 1) esencialmente se basa en la morfología al microscopio óptico presentada por los dos estadios del ciclo de vida de las AVL: la forma activa o trofozoíto y la de resistencia o quiste. También se incluyeron en la clasificación, características tales como el comportamiento fisiológico y biológico de las amebas (crecimiento en cultivos, infección de animales experimentales, osmotolerancia, termotolerancia, etc).

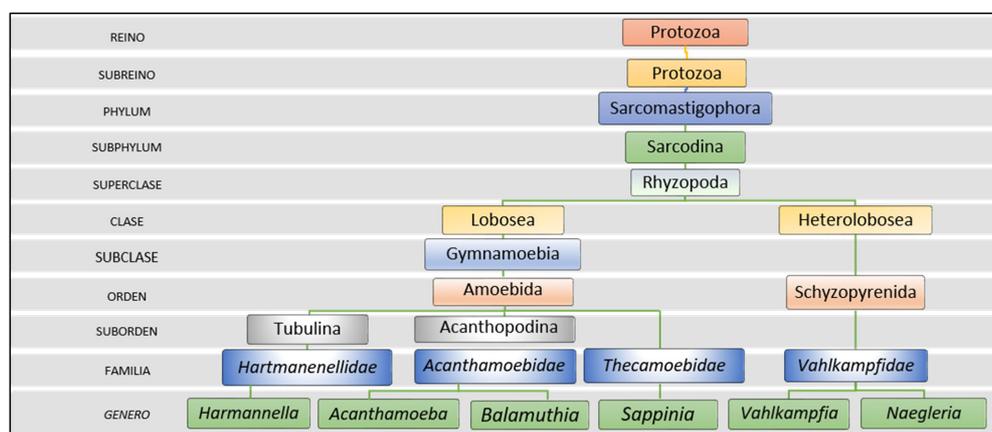


Figura 1. Clasificación de las amebas de vida libre patógenas.

Adaptado de: Page, 1988; Visvesvara *et al.*, 2007.

Sin embargo, la taxonomía de las AVL no estaba completamente definida y ha sido modificada con revisiones diversas, reflejando en la actualidad, nuevos datos a partir de estudios de la secuencia genómica, por lo que la Sociedad Internacional de Protozoólogos (Adl *et al.*, 2012) propuso una nueva clasificación taxonómica, basada en enfoques morfológicos, bioquímicos y

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

moleculares. Según este nuevo esquema, los eucariotas han sido clasificados en seis grupos o “Super grupos”, es decir, Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata (Figura 2). Los cuatro géneros más importantes de AVL patógenos de humanos han sido clasificados en dos “Super” grupos, a saber, Amoebozoma y Excavata: *Acanthamoeba* y *Balamuthia* fueron clasificados bajo el Super Grupo Amoebozoa: **Acanthamoebidae**; *Naegleria fowleri* en el Super Grupo Excavata: **Heterolobosea: Vahlkampfiidae**; y *Sappinia* bajo Super Grupo Amoebozoa: **Flabellinea: Thecamoebidae** (Adl *et al.*, 2005; Smirnov *et al.*, 2005; Visvesvara *et al.*, 2007; Adl *et al.* 2012).

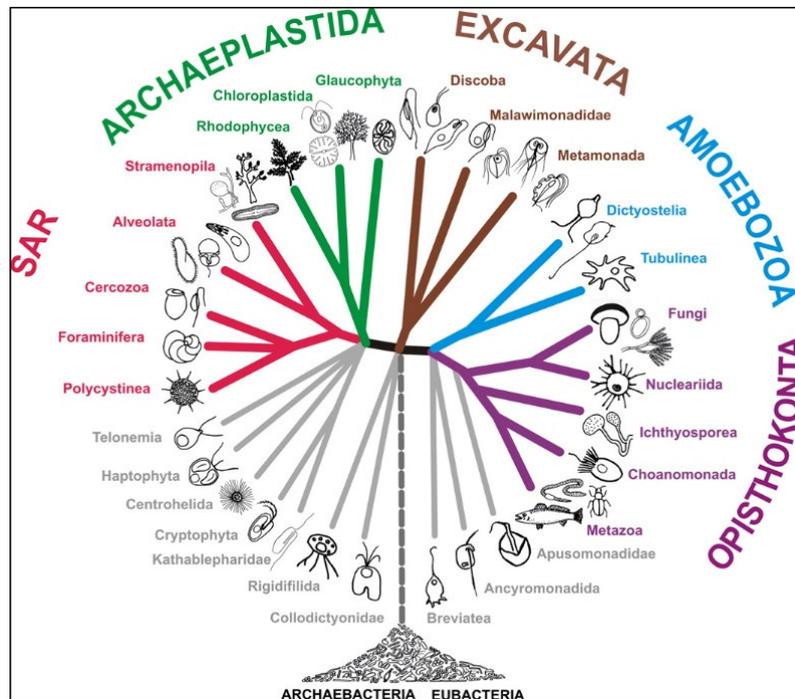


Figura 2. Filogenia de los Eukaryota.

Tomado de: Adl *et al.* 2012.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

3. Morfología general y ciclo de vida de las amebas de vida libre.

Las AVL mantienen su ciclo de vida en el ambiente, o bien, por ser algunas de ellas parásitos facultativos, pueden afectar a varios hospedadores (animales y humanos), llevando a cabo un ciclo de vida monoxeno (Figura 3).

Durante el ciclo, presentan dos estadios: trofozoíto o forma vegetativa y quistes o formas de resistencia. Los trofozoítos, del griego: *τρόφος* *tróphos*, que se alimenta y *ζῷο* *zōio*: anima (Real Academia Española, 2016-b) son la forma metabólicamente activa, que se alimenta, se mueve y se multiplica. Los quistes se originan de la producción de una cubierta protectora por parte del trofozoíto cuando se encuentra en condiciones adversas de temperatura, humedad, pH, nutrientes, presión osmótica, etc., la cual lo recubre y lo convierte en la forma de resistencia. Dentro del quiste, el trofozoíto se mantiene inactivo, hasta encontrarse en un entorno favorable, lo que inicia el proceso de desenquistamiento: así, diversos factores como la humedad, la temperatura y los nutrientes afectan su cantidad y diversidad (Schuster y Visvervara, 2004-b).

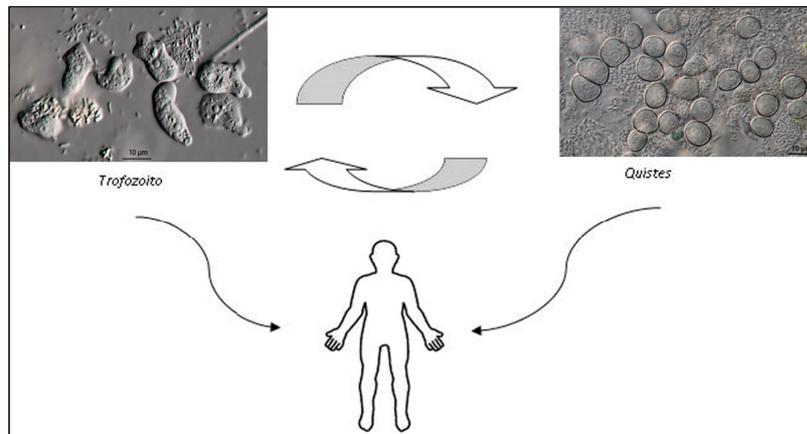


Figura 3. Ciclo de vida general de las AVL (*Naegleria gruberi*).

Adaptado de: <http://www.arcella.nl/naegleria-gruberi>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

La forma y tamaño de los trofozoítos y quistes de los distintos géneros de AVL son variables, teniendo dimensiones desde 10 hasta 200 μm y con formas diversas, de acuerdo al género y especie.

En cuanto a las especies patógenas, tanto los trofozoítos como los quistes suelen ser las formas infectantes para los hospedadores, aunque solo el trofozoíto es la forma invasiva de los tejidos que afectan.

3.1 Estructura celular.

Las amebas, como todos los protozoos, son organismos unicelulares e independientes, capaces de llevar a cabo diversas funciones, gracias a las estructuras que poseen (Figura 4).

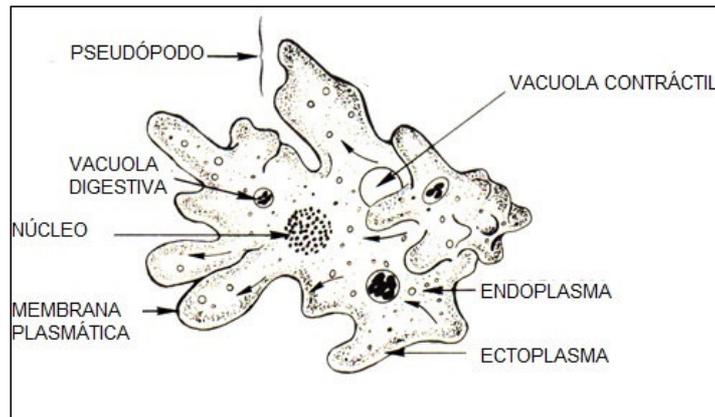


Figura 4. Esquema de un trofozoíto de AVL.

Adaptado de: Scott Foresman, 2007

El trofozoíto se compone, al igual que otras células, de una *membrana plasmática* que contiene un citoplasma, en el cual están incluidos los orgánulos particulares de este tipo de protozoo. La membrana plasmática permeable sirve como una barrera mecánica y química,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

permitiendo el intercambio de materiales con el medio externo. Por debajo de la membrana plasmática, a nivel ultraestructural para el sostén de la célula, se encuentra el *citoesqueleto*, conformado por microfilamentos, lo que le permite cierta flexibilidad a la célula para los cambios morfológicos necesarios para la alimentación y el movimiento.

El citoplasma es el material protoplasmático que contiene los orgánulos orgánulos celulares, incluyendo el núcleo, separados ambos por la membrana nuclear. Entre otros orgánulos, se describen el aparato de Golgi, retículo endoplasmático, mitocondrias, ribosomas y vacuolas de diferente naturaleza. Al microscopio óptico, es posible evidenciar el o los núcleos, vacuolas digestivas y vacuolas contráctiles, además de la formación de los pseudópodos para el movimiento y la alimentación. Puede existir en algunas especies, una adaptación de la membrana plasmática a manera de boca celular denominada citostoma, por donde se realiza la ingestión de nutrientes.

El *núcleo* de los trofozoítos puede variar en número de acuerdo al género y especie, (uni, bi o multinucleares, como el caso de *Balamuthia mandrillaris*), así como en la forma, siendo en general redondeado y en algunos casos, fragmentado o granuloso.

La vacuola contráctil tiene como función el mantener el equilibrio osmótico, regulando la expulsión del exceso de agua del citoplasma. El número de vacuolas contráctiles varía en las diferentes amebas, desde estar ausente, como en las especies marinas, hasta tener una o dos.

En cuanto a *los pseudópodos*, su descripción permite la caracterización morfológica de algunos géneros de AVL. Los pseudópodos se producen por la movilización del citoplasma, originando expansiones o proyecciones de la membrana plasmática. Estas proyecciones además permiten al protozoo adherirse, moverse y nutrirse. Pueden ser de varios tipos (Figura 5) según su aspecto (Page, 1976; Adl *et al.*, 2012):

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

- **Lobopodios:** son proyecciones más o menos amplias, cortas y con extremos redondeados, típicos de Amoebozoa; tienen una región clara hialina en la parte delantera; los lobopodios son muy finos y planos, se denominan llamados lamellipodios. En algunas especies, se forman sub-pseudópodos finos o filosos a partir de lobopodios hialinos y cónicos, tal como los **acanthopodios**, los cuales le dan el nombre al Género *Acanthamoeba*.
- **Filopodios:** son extensiones más finas y con los extremos puntiagudos, consistiendo principalmente en ectoplasma, algunas veces ramificados.
- **Rizopodios:** también conocidos como pseudópodos reticulados, en donde los finos pseudópodos individuales se amontonan entre sí y forman una red irregular en el exterior del protozoo. Se observan, por ejemplo, en los Cercozoa.
- **Axopodios:** son pseudópodos finos, largos y rígidos. Están sostenidos interiormente por una varilla axial (que recorre el largo del pseudópodo) formada por complejos grupos de microtúbulos y envuelta por el citoplasma. Se observan en radiolarios y en heliozoos.

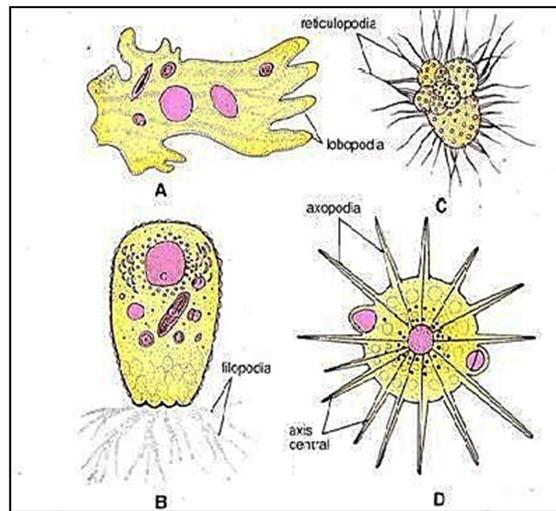


Figura 5. Diferentes tipos de pseudópodos en AVL: A: lobopodios, B: filopodios C: reticulopodios, D: axopodios.

Adaptado de Khandelwal.,2016.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Algunos géneros pueden presentar *flagelos* transitorios para su locomoción, como ocurre con los vahlkampfidios del género *Naegleria*, los cuales tienen una fase flagelada temporal que en la mayoría de las especies está ausente o es difícil de inducir en otras. La etapa flagelada carece de un citostoma y suele ser biflagelada e incapaz de dividirse en algunas especies (De Jonckheere *et al.*, 2001).

El quiste es la forma de resistencia, el cual presenta una estructura externa de mayor complejidad, la pared quística, constituida generalmente por 2 capas: una externa o ectoquiste, de naturaleza proteica y otra interna o endoquiste, con un importante porcentaje (30%) de celulosa (Werth y Kahn, 1967; Lorenzo-Morales *et al.*, 2008; Klieščíková, 2013); en algunos géneros como *Balamuthia*, existe una tercera capa, el mesoquiste, intermedia entre el exo y el endoquiste. Entre el ecto y el endoquiste, hay poros de contacto entre ambos llamados ostiolo, por donde el trofozoíto sale durante el proceso de desenquistamiento, al encontrar condiciones externas favorables (Figura 6).

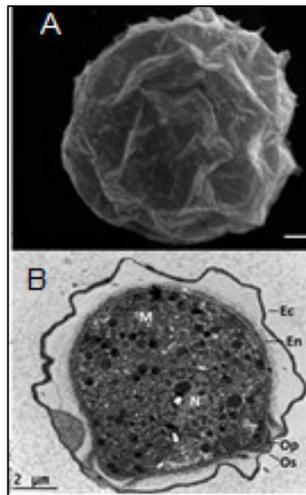


Figura 6. Microscopía electrónica de un quiste de *Acanthamoeba* spp. A. Microscopía electrónica de escaneo. B. Microscopía electrónica de transmisión. Ec, ectoquiste; En, endoquiste;; N, núcleo; Op, opérculo; Os, ostiolo. Escala = 2 µm.

Adaptado de: Fouque *et al.*, 2012

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Las distintas formas y tamaños que presentan los quistes facilita la identificación de algunos géneros y en cuanto a su constitución, ésta le confiere gran resistencia a condiciones ambientales adversas, permitiéndole una viabilidad de hasta 20 años (Page, 1988; Siddiqui y Khan, 2012).

3.2 Biología de las AVL.

Las AVL se consideran como un grupo cosmopolita y viven en suelos, aguas marinas, agua dulce y en las partes aéreas de plantas y animales, alimentándose de bacterias, levaduras y otros organismos, dividiéndose por fisión binaria. Se han encontrado en todos los continentes, en diversas altitudes y son capaces de resistir temperaturas de hasta 45 grados. Su ciclo biológico es monoxénico, ya que no incluye hospedadores intermediarios y a diferencia de los parásitos estrictos, las AVL pueden completar su ciclo biológico en el entorno sin entrar en un hospedador humano o animal (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Pueden hallarse en suelos o sedimentos, bien sea unidas a partículas en suspensión en columnas de agua, en los primeros 30 μm de la superficie del agua, o en los cuerpos de plantas y animales sumergidos. Estos microorganismos no distinguen entre ambientes terrestres o acuáticos porque viven en las interfaces entre ellos. Su transmisión puede ser a través las corrientes de viento y el agua. Una vez en el aire, los quistes y los trofozoítos se comportan como cualquier otra materia particulada en suspensión, dependiendo por tanto, de la dinámica atmosférica (Rodríguez-Zaragoza, 1994).

Las AVL se alimentan por fagocitosis de una variedad de bacterias, algas verde- azules, hongos y células del medio que los rodea, así como por pinocitosis. Ante condiciones adversas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

(temperaturas extremas, desecación, depleción de nutrientes, acumulación de productos de desecho o agentes químicos), estos protozoos se enquistan.

En el suelo, los diversos protistas como las amebas, flagelados y ciliados, influyen en la estructura de la comunidad microbiana y mejoran el reciclaje de nutrientes. Entre estos organismos, las AVL son los consumidores bacterianos dominantes y son responsables de hasta el 60% de la reducción total de la población bacteriana: las bacterias son los principales encargados de la descomposición de la materia orgánica, pero son ineficientes en la liberación de minerales a partir de su propia masa. Entre los organismos secundarios en realizar los procesos de descomposición, están las AVL, las cuales consumen a los organismos primarios (bacterias) y liberan nutrientes minerales como productos de desecho que están enlazados a la biomasa de las bacterias, contribuyendo así al funcionamiento de los ecosistemas (Siddiqui y Khan, 2012).

En algunos casos, las bacterias ingeridas por las AVL son capaces de evitar la digestión por parte del protozoo y beneficiarse de la relación con este. Al compartir ambientes en común con las bacterias nichos, algunas de carácter zoonótico, se puede establecer una relación endosimbiótica con la ameba, pudiendo sobrevivir en las vacuolas del protozoo desde días hasta meses. Todo ello implica gran importancia en la salud pública por tener carácter antropozoonótico algunos de los géneros bacterianos involucrados en esta interacción (Mella *et al.*, 2016).

Las amebas son tolerantes de un amplio rango de osmolaridades, lo que les permite sobrevivir en agua destilada, agua de mar, cultivos de tejidos y fluidos corporales de mamíferos. Igualmente, pueden encontrarse en ambientes con diferentes grados de temperatura. Tanto la termotolerancia como la osmotolerancia son factores determinan el potencial patógeno de una ameba, por lo cual han sido empleados como pruebas fisiológicas en el laboratorio: los aislados

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

que suelen crecer a temperaturas mayores a 37 °C y tolerar altas concentraciones de solutos (manitol), han sido clasificados como más virulentos, sin embargo, no son los únicos factores que influyen en la patogenicidad de un aislado ni tampoco la confirman (Griffin, 1972; De Jonckheere *et al.*, 1980; Khan *et al.*, 2001, 2002; Schuster y Visvesvara, 2004-b).

Las amebas puede ser cultivadas y mantenidas en el laboratorio usando una variedad de medios, para diferentes propósitos: estudiar su comportamiento, sus requerimientos nutricionales, evaluar opciones terapéuticas, estudios filogenéticos y como medio diagnóstico (Schuster, 2002). El medio más empleado en los distintos laboratorios clínicos y los de investigación a nivel internacional, es el agar no nutritivo (ANN) cubierto con una capa de bacterias, generalmente Gram negativas y no encapsuladas, ya que la presencia de una cápsula mucoide inhibe la fagocitosis por las amebas. Suele emplearse *Escherichia coli* inactivada por calor. Las amebas se alimentan de las bacterias hasta que se acaban y luego se enquistan. Los quistes permanecen viables durante periodos prolongados de tiempo, especialmente si la placa de ANN está sellada, para evitar que se sequen y mantenerse a una temperatura inferior.

Algunas amebas como *Naegleria* y *Acanthamoeba* pueden establecerse en cultivos axénicos o libre de bacterias, como el medio proteosa peptona- levadura- glucosa (PYG), posterior a lavados en agua destilada o solución salina para eliminar la mayor parte de las bacterias y luego inocular las células lavadas en el medio que contiene antibióticos. Una combinación de penicilina, estreptomycin o gentamicina es eficaz en inhibir o matar las bacterias residuales presentes en el inóculo de las amebas, el cual luego puede mantenerse sin antibióticos.

Estos medios en general permiten el crecimiento de la mayoría de las amebas de vida libre, sin embargo, *Balamuthia mandrillaris* necesita de cultivo celular para su desarrollo y también se puede cultivar axénicamente en un medio complejo sin células, como el BM-3 (Schuster y

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Visvesvara, 1996) que contenga suero fetal bovino (Visvesvara, 2010), así como en el BM-3 modificado por Lares *et al.*, 2015.

4. Amebas de vida libre patógenas.

4.1 Género *Acanthamoeba*

4.1.1 Generalidades.

Las amebas del género *Acanthamoeba* fueron inicialmente descritas por Castellani, en 1930, al observar una ameba contaminante en cultivos de *Cryptococcus pararoseus* y Douglas la incluyó en el Género *Hartmannella*, denominándola *H. castellani*. En 1931, fue reclasificada por Volkonski como *Acanthamoeba castellani* (Marciano Cabral y Cabral, 2003; Oddó 2006).

En 1958, Clyde Culbertson y colaboradores demostraron la patogenicidad de estas amebas en animales de experimentación, luego de inducir una encefalitis en ratones al inocular un aislado de *Acanthamoeba* que contaminó cultivos celulares durante la producción de vacunas contra la poliomielitis en los Laboratorios Lilly, denominándola inicialmente como *Acanthamoeba* spp. cepa Lilly A-1, para posteriormente cambiar el nombre a *A. culbertsoni* en honor al Dr. Culbertson (Oddó, 2006).

La morfología característica de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* permite la identificación del género, no así la de las especies o genotipos. En 1967, Page y luego Pussard y Pons en 1977 propusieron tres grupos morfológicos (I, II y III), basándose en el tamaño y la forma de los quistes (Page, 1967-b; Pussard y Pons, 1977). Por las alteraciones que pueden experimentar las amebas en los cultivos y la subsecuente subjetividad en los criterios morfológicos, la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Introducción

diferenciación de especies se enfocó sobre la base de criterios inmunológicos, bioquímicos, fisiológicos y más recientemente, los moleculares. La variación de la secuencia del gen de la subunidad ribosomal pequeña (ADNr 18S o *SSU* ADNr), concretamente la región 29-1 llamada fragmento diagnóstico DF3, ha permitido establecer, hasta ahora, 20 genotipos diferentes dentro del género *Acanthamoeba* (T1-T20), con un mínimo de 5% de divergencia entre los genotipos (Gast *et al.*, 1996, Stothard *et al.*, 1998; Nuprasert *et al.*, 2010; Magnet *et al.*, 2014; Corsaro *et al.*, 2015, Fuerst *et al.*, 2015; Qvarnstrom *et al.*, 2013; Corsaro *et al.*, 2017-b). Cabe destacar que los aislados causantes de la mayoría de las infecciones en humanos pertenecen al genotipo T4 (Marciano Cabral y Cabral, 2003; Siddiqui y Khan, 2012; Trabelsi *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2016).

4.1.2 Morfología

El Género *Acanthamoeba* presenta dos estadios durante su ciclo de vida:

- **Trofozoíto** o forma activa, cuya reproducción es por fisión binaria, son de tamaño variable según la especie, entre 15 y 40 μm , emite pseudópodos hialinos anchos en distintos polos, con producción de filopodios, tipo acanthopodios. La diferenciación entre el ectoplasma y el endoplasma es evidente y en este último se observan mitocondrias, ribosomas y numerosas vacuolas, principalmente de naturaleza digestiva. Suele presentar una vacuola contráctil hacia el extremo posterior. Son uninucleados, con un gran nucléolo rodeado de un halo claro. Es la forma infectante e invasiva (Figura 7-A).
- **Quistes** o formas de resistencia y de transmisión del protozooario, tienen unas medidas entre 13 y 30 μm , variable de especie a especie. Presentan una doble pared: una capa externa o ectoquiste, la cual es generalmente festoneada y está formada por proteínas

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

y lípidos; una capa interna, llamada endoquiste, la cual suele ser poliédrica, estrellada presentando puntas y constituido por celulosa. Los puntos de unión entre el ecto y el endoquiste se definen como poros u ostiolas, La forma puede ser poliédrica, estrellada, oval o esférica, dependiendo de la distribución de las puntas del endoquiste. Presentan un solo núcleo y se observan pequeños gránulos en la periferia del citoplasma. Son muy resistentes a la desecación (Figura 7-B).

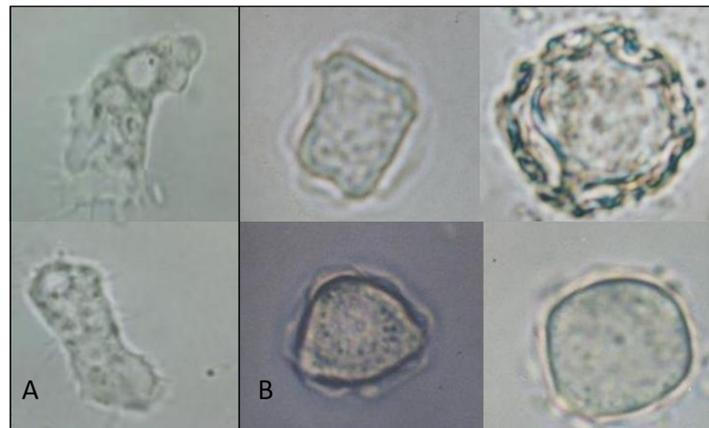


Figura 7. *Acanthamoeba* spp: A) trofozoítos; B) quistes

Adaptado de: Pérez de Galindo *et al.*, 2012

4.1.3 Ciclo de vida y biología.

Acanthamoeba es el género de AVL mayormente distribuido en el ambiente, siendo aislada de diferentes suelos y aguas, desde el Antártico hasta zonas áridas, tanto de aguas limpias para uso doméstico como de aguas contaminadas; en superficies diversas de uso cotidiano para el humano, tales como unidades de ventilación, aire acondicionado y calefacción, humidificadores,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

hidromasajes, unidades dentales, máquinas de diálisis, de polvo en el aire, lentes de contacto y cajas de almacenaje, así como muestras anatómicas varias tanto de individuos sanos como de los infectados: oído, pulmón, mucosa nasofaríngea, cerebro, piel y córnea (Martínez, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004-a, 2004-b; Visvesvara *et al.*, 2007; Reyes Batlle *et al.*, 2016). Pueden asumirse como patógenas aquellas especies aisladas de lesiones en el organismo humano, pero no debe hacerse lo mismo con respecto a las especies obtenidas del ambiente.

Las amebas del género *Acanthamoeba* se encuentran en el ambiente como trofozoítos, reproduciéndose por división binaria, con un proceso mitótico (la membrana nuclear no permanece intacta). Bajo la forma de resistencia o quiste, pueden mantenerse viables hasta por 20 años (Marciano Cabral y Cabral, 2003).

Los trofozoítos y quistes son las formas infectantes, ingresando al cuerpo a través de diversas puertas de entrada: a través del ojo, vías respiratorias superiores/ inferiores y piel, con o sin ruptura de la misma (Figura 8). Cuando *Acanthamoeba* spp. entra en el ojo, puede causar queratitis grave en personas sanas, especialmente en usuarios de lentes de contacto; cuando entra en el sistema respiratorio o a través de la piel, puede invadir el sistema nervioso central por diseminación hematológica causar encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) o enfermedad diseminada, lesiones cutáneas, en individuos con el sistema inmune comprometido. Los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp. pueden ser evidenciados en el tejido afectado.

El género *Acanthamoeba* ha recibido recientemente mucha atención debido a su rol como hospedador de patógenos bacterianos (endosimbiontes), como *Legionella* spp., *Francisella tularensis*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Afpia felis*, *Escherichia coli* serotipo O157, *Chlamydia* spp y de virus tales

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

como *Echovirus*, *Adenovirus*, *Mimivirus* y *Pandoravirus*. En consecuencia, estas amebas pueden tener un papel importante en la etiología de algunas enfermedades bacterianas de la comunidad y en un entorno nosocomial (Schuster y Visvesvara, 2004-b; Visvesvara *et al.*, 2007; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007-a; Visvesvara, 2010; Scheid, 2015, 2016; Guimaraes *et al.*, 2016; Mella *et al.*, 2016). Por todo esto, este género es el más referenciado a nivel mundial en cuanto a patologías producida por AVL se refiere.

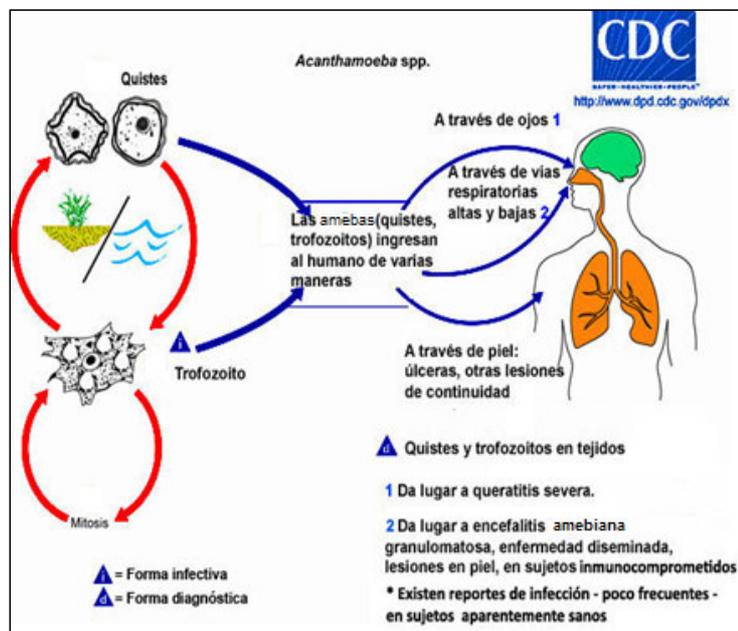


Figura. 8. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Adaptado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

4.2 Género *Naegleria*. *Naegleria fowleri*.

4.2.1 Generalidades.

Los protozoos del género *Naegleria* son ameboflagelados, por tener un tercer estadio en su ciclo biológico: una fase transitoria flagelada, aparte del trofozoíto ameboide y del quiste. Posee más de 40 especies, pero sólo *N. fowleri* es la única especie reportada como patógena para el ser humano y *N. australiensis* y *N. italica*, para animales de experimentación (De Jonckheere, 2011; De Jonckheere, 2014).

Las primeras descripciones de las amebas del género *Naegleria* fueron realizadas por el científico austriaco Franz Schardinger, quien publicó dibujos de una ameba que se transformaba en flagelado. En 1909, Kart Naegler describió una ameba no patógena, *Naegleria gruberi*, considerada posteriormente en 1912 como *Digastigomoeba* por Alexeieff. Esta ameba es morfológicamente similar a la especie patógena, que posteriormente, en 1970, fue denominada *Naegleria fowleri* por Rodney Carter, en honor a Malcolm Fowler, quien describió los primeros casos de infección cerebral en humanos (Fowler y Carter, 1965; Oddó, 2006, Visvesvara *et al.*, 2007; De Jonckheere, 2002, 2014).

Las técnicas de biología molecular basadas en el estudio del gen ARNr 5.8S y espaciadores de transcripción internos (ITS1 e ITS2) de diferentes tamaños han sido capaces de detectar simultáneamente *Naegleria fowleri* y otras especies de *Naegleria* en el medio ambiente. Los tipos de *N. fowleri* se caracterizan por la longitud de las ITS1 (de 42 pb a 142 pb) y por la presencia de una diferencia de un nucleótido, C en vez de una T en la posición 31 en la secuencia del ADNr 5.8S (De Jonckheere, 2011).

De los ocho tipos conocidos de *N. fowleri*, los ITS1 se caracterizan por dos secuencias principales (M1 y M2), presentes en cada tipo y dos secuencias de repetición (R1 y R2), presentes

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Introducción

en diversos números (De Jonckheere, 2011). Con todas las técnicas utilizadas, *Naegleria lovaniensis* parece ser el pariente más cercano de *N. fowleri* (De Jonckheere, 2002).

Hasta el momento, se han descrito 47 especies diferentes en el género *Naegleria*, que sólo se pueden identificar por los ITS y por la secuencia del ADNr 5.8S. Además del patógeno humano *N. fowleri*, también *N. australiensis* y *N. italica* han demostrado ser patógenas, al producir la muerte de animales de experimentación. Sin embargo, no se ha informado de infección humana por alguna de estas dos especies (De Jonckheere, 2002; De Jonckheere, 2014).

4.2.2 Morfología.

Naegleria fowleri presenta tres estadios durante su ciclo biológico:

Trofozoíto ameboide: El trofozoíto mide de 10 a 25 μm , presentan forma elongada, digitiforme, al generar uno o dos pseudópodos, eruptivos, hialinos, redondeados, de tipo lobopodios durante su movimiento, el cual suele ser rápido. Posee un único núcleo con un nucléolo central prominente (Figura 9-A). El citoplasma contiene numerosas mitocondrias, ribosomas, vacuolas de alimentos y una vacuola contráctil. El extremo posterior o polo uroide es muy adherente y a menudo tiene varios filamentos, a los cuales las bacterias pueden fijarse. La forma ameboide es la que se alimenta y divide y se considera la forma infectante e invasiva (Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011; Pérez de Galindo *et al.*, 2012).

Trofozoíto flagelado: los flagelados de este género tienen forma redondeada u ovalada, con una longitud de 10 a 16 μm ., posee un solo núcleo con un nucléolo grande, ubicado siempre hacia el extremo anterior respecto a la dirección del movimiento y generalmente tiene dos flagelos anteriores, pero en ocasiones también pueden verse tres o cuatro flagelos (Figura 9-B). No tiene un citostoma, por lo tanto, no pueden alimentarse. El flagelado se considera un estado transitorio,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

que se genera al encontrarse el trofozoíto ameboide en condiciones de hipotonicidad del medio acuático donde se encuentra. A partir de este estado se revierte a la forma ameboide, en una hora o menos (Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011, Pérez de Galindo *et al.*, 2012).

Quistes: son esféricos, entre 8 a 12 μ de diámetro mayor, aunque pueden alcanzar hasta 20 μ , tienen un contorno liso y una pared refringente densa, con uno o dos poros aplanados (Figura 9-C). Los quistes de *N. fowleri* no se observan en los tejidos infectados, sólo se aprecian en el medio ambiente (Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011).

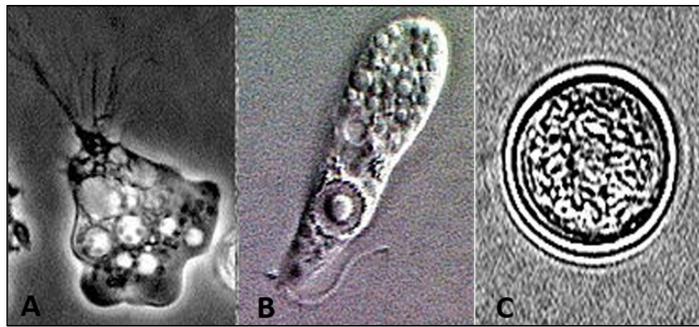


Figura 9. *Naegleria fowleri*: A- trofozoíto ameboide; B- trofozoíto flagelado; C- quiste.

Adaptado de: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria>

4.2.3 Ciclo de vida y biología.

El género *Naegleria* comprende especies patógenas y no patógenas. Todas las especies patógenas son termófilas pero no todas las termófilas son patógenas, como *N. lovaniensis*. Termofilia se define como la capacidad de crecer a 40 °C o más. *N. fowleri* es termófila, capaz de crecer hasta 45 °C, proliferando durante los meses más cálidos del año, justo en coincidencia con diversas actividades acuáticas recreativas de las personas (De Jonckheere, 2002; Visvesvara *et al.*,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

2007; Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011; Latiffi *et al.*, 2017), incluso en aguas de consumo humano (Morgan *et al.*, 2016). Sólo unas pocas especies muestran algunas peculiaridades, tal como presentar flagelados con capacidad de dividirse, mientras que algunas especies no forman flagelados (De Jonckheere, 2002). Estos fenómenos han sido descritos para otros vahlkamfidos, pero para el género *Naegleria*, la mayoría de las especies no se divide en estado flagelar (De Jonckheere, 2014).

El mecanismo de la división nuclear es una promitosis, durante la cual el nucléolo y la membrana nuclear persisten durante la división de la célula. El nucléolo se alarga y forma una estructura en forma de mancuerna antes de dividirse (Martínez y Visvesvara, 1997). Los trofozoítos se transforman temporalmente a flagelados, los cuales suelen volver a la etapa de trofozoíto amebioide, para enquistarse si las condiciones le son adversas (Figura 10). Los trofozoítos infectan a seres humanos o animales penetrando a través de la mucosa nasal y migran al cerebro, vía nervios olfativos, ocasionando la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP). Los trofozoítos de *Naegleria fowleri* pueden encontrarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejido, no así los quistes.

N. fowleri está ampliamente distribuida en el suelo y agua, aunque no es tan común como *Acanthamoeba*. Se puede encontrar en lagos, agua de piscinas poco cloradas, acuarios, aguas residuales, canales de riego, estanques, aguas termales, etc. (Visvesvara, 2013). También se ha aislado de la mucosa nasal de niños sanos asintomáticos y de fosas nasales de pacientes con MAP. Pero no se ha encontrado en agua de mar, mostrando una sensibilidad a la alta osmolaridad del medio (Visvesvara, 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

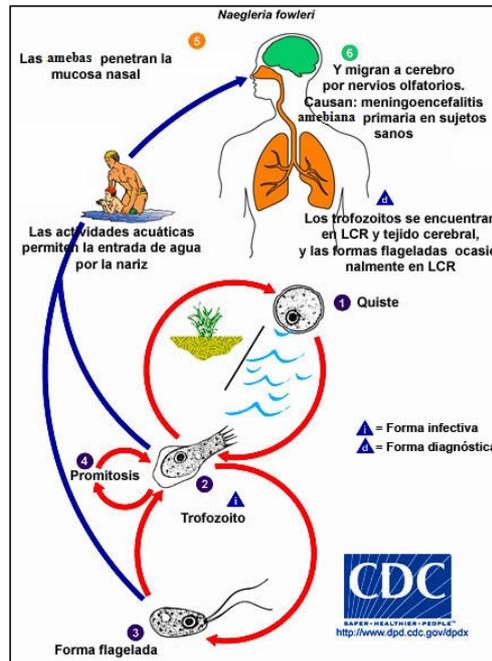


Figura 10. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*

Adaptado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>.

4.3 Género *Balamuthia*: *Balamuthia mandrillaris*.

4.3.1 Generalidades

En 1986, una ameba morfológicamente diferente a las patógenas conocidas, fue aislada del cerebro de un mandril (*Papio sphinx*) que murió de una enfermedad neurológica en el Zoológico de San Diego (Zoo Wild Animal Park, CA) en Estados Unidos. Esta ameba, que genera una encefalitis granulomatosa con presencia de quistes en las lesiones, fue descrita inicialmente como una ameba de la familia *Leptomyxidae*. Pero en 1993, fue excluida de dicha familia, por sus características morfológicas al microscopio óptico y electrónico. Estas diferencias también se

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

encontraron en las diferentes pruebas de patogenicidad en animales, análisis antigénicos y secuenciación de ARN ribosómico, por lo que fue ubicada en un nuevo género y especie. *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara *et al.*, 2007; Siddiqui y Khan, 2007; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Diferentes aislados clínicos mantenidos en cultivos han sido estudiados para la variación de la secuencia del ADN de la subunidad pequeña mitocondrial ARNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y el gen P de la ribonucleasa (ARNasa), demostrándose que todos los aislados de *Balamuthia* son miembros de una sola especie, con variación de la secuencia entre 0 y 1.8% entre aislados (Booton *et al.*, 2003; Yagi *et al.*, 2005; Kiderlen *et al.*, 2008; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

4.3.2 Morfología.

B. mandrillaris presenta dos estadios en su ciclo biológico: el trofozoíto y el quiste:

Trofozoíto: se caracteriza por un pleomorfismo, cuyas medidas oscilan entre 12 y 60 μ m. Son células uninucleadas, aunque en ocasiones se observan formas binucleadas. El núcleo contiene un nucléolo denso grande colocado centralmente, sin embargo, se han observado trofozoítos con dos o tres cuerpos nucleolares, especialmente en los tejidos infectados (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013). Tiene un retículo endoplasmático peculiar acintado y se desplazan lentamente con un movimiento es muy diferente al observado en la mayoría de las AVL: emite unas largas elongaciones en forma de dedos (Figura 11-A), que recuerdan al patrón de movimiento de las arañas (Visvesvara *et al.*, 1993; Schuster *et al.*, 2004-a).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

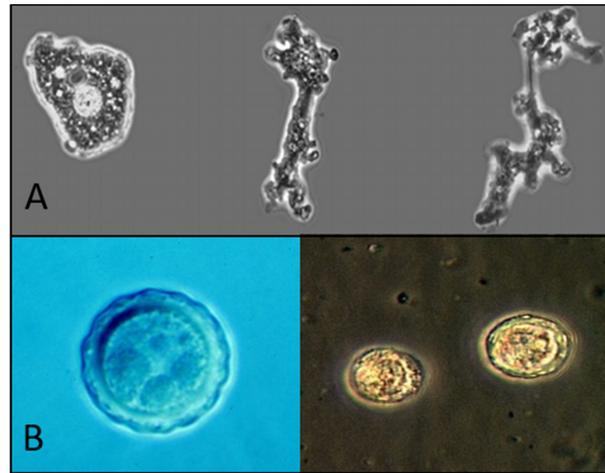


Figura.11. *Balamuthia mandrillaris*: A. Trofozoítos B. Quistes.

Adaptado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>.;https://www.researchgate.net/figure/281486460_fig1.

Quistes: también son uninucleados y de morfología esférica. Su tamaño varía entre 12 y 30 μm y al microscopio óptico se puede observar una doble pared, donde el exoquiste es ondulado y el endoquiste redondo (Figura 11-B). Contrario al género *Acanthamoeba*, no se observan los poros en la pared. Sin embargo, la pared del quiste, ultraestructuralmente, tiene tres capas: un ectoquiste exterior, delgado e irregular, un mesoquiste intermedio amorfo de naturaleza fibrilar y un endoquiste interno grueso (Visvesvara *et al.*, 2010).

4.3.3 Ciclo de vida y biología.

El ciclo biológico de *B. mandrillaris* es monoxénico, al igual que las demás AVL (Figura 12). En los hospedadores afectados, se ha descrito causando lesiones en la piel y encefalitis, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Tanto el trofozoíto como el quiste son formas infectantes, las cuales pueden ingresar en el cuerpo humano a través de alteraciones de la piel, o por vía nasal. *Balamuthia* puede llegar al sistema nervioso central por vía hematogena,

Introducción

causando encefalitis granulomatosa amebiana (EGA), así como causar lesiones cutáneas localizadas (Lorenzo Morales *et al.*, 2013).

B. mandrillaris está presente en suelos y no es fácil de aislar ni de cultivar: no puede cultivarse en los cultivos convencionales para amebas como el agar no nutritivo con bacterias, debido a que no se alimenta de ellas. Por ello, para su crecimiento *in vitro* se requiere el uso de cultivos celulares como fuente de alimento (Trabelsi *et al.*, 2012).

Balamuthia puede alimentarse de pequeñas amebas (ej. *Acanthamoeba* y *Naegleria*) *in vitro* e incluso en la naturaleza. Su aislamiento a partir de suelos se complica debido a que otros organismos (protozoos y hongos) también presentes en las muestras ambientales encubren su presencia. Puede ser aislada a partir de tejido humano o animal y mantenido en el laboratorio utilizando cultivos de células de mamíferos como riñón de mono, fibroblastos de pulmón humano y las células endoteliales microvasculares del cerebro humano, alimentándose de la monocapa celular y barriéndola en pocos días (Schuster, 2002). También crece axénicamente en medios sin células (Lares *et al.*, 2015). En el cultivo, el organismo es sensible a cambios en la osmolaridad y no tolera fácilmente las condiciones hipo o hiperosmóticas (Matin *et al.*, 2008).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

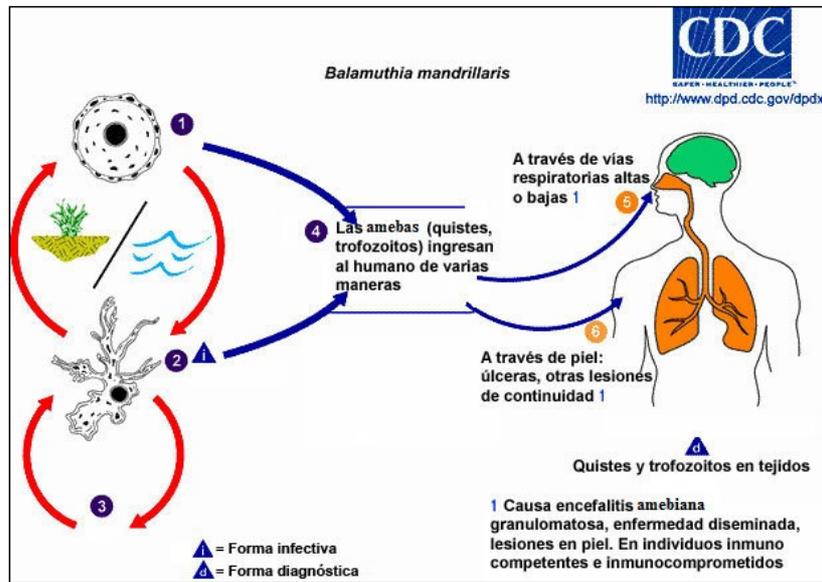


Figura. 12. Ciclo evolutivo de *Balamuthia mandrillaris*

Adaptado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>.

4.4 Género *Sappinia*.

4.4.1 Generalidades

El Género *Sappinia* comprende tres especies: *S. pedata*, *S. diploidea* y *S. platani*, aunque inicialmente fue descrito con una sola: *S. pedata*, por Pierre Augustin Dangeard en 1896, como homenaje al micólogo Sappin-Trouffy, destacándola como una ameba binucleada y con un glicocálix denso. La segunda especie de *Sappinia*, *S. diploidea*, fue descrita originalmente como *Amoeba diploidea* por Max Hartmann y Kurt Nägler en 1908, al aislarla de contenido intestinal de un lagarto (*Lacerta agilis*), teniendo como característica más notable el mantener los núcleos

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

autonómicos durante todo el ciclo de vida y por ende, generar una célula diploide (Walochnik *et al.*, 2010). Wylezich y colaboradores revelaron en 2009 que algunas cepas de *S. diploidea*, aun manteniendo una cercanía relativa con esta especie, tienen una gran distancia genética entre sí, sugestivo de especies crípticas. Por esta razón, una tercera especie, *S. platani*, fue propuesta para la cepa de *S. diploidea-like* PL - 247 (Wylezich *et al.*, 2015; Corsaro *et al.*, 2017-a).

Inicialmente, *Sappinia* se consideró como coprozoico, por sus primeros aislamientos en estiércol animal. Sin embargo, esta AVL se distribuye ampliamente en el medio ambiente y se ha aislado de suelo, agua dulce, heces de mamíferos, hojarasca de bosques, ciervos, bisontes, ganado y en el intestino de lagartos. Se ha descrito en Europa, América del norte, Egipto, Medio Oriente, las Antillas y Japón (Visvesvara *et al.* 2007; Trabelsi *et al.*, 2012).

Sappinia sp. no fue implicada como patógena para animales y humanos hasta la descripción de un caso de encefalitis causada por esta ameba, en un paciente joven inmunocompetente que sobrevivió a la infección (Gelman *et al.*, 2001; Gelman *et al.*, 2003). En este caso, la ameba se identificó originalmente como *S. diploidea*, pero más adelante, gracias al uso de la PCR en tiempo real (PCR-*real time*), basada en secuencias del gen del ARNr 18S, se logró identificar como *S. pedata* (Qvarnstrom *et al.*, 2009). Un estudio filogenético más reciente y exhaustivo indicó que esta variedad podría ser en realidad una nueva especie dentro de este género, que está estrechamente relacionada con *S. pedata* (Wylezich *et al.*, 2009).

4.4.2 Morfología.

Durante el ciclo de vida de este parásito, se describen dos estadios: trofozoíto y quiste.

El trofozoíto (40 – 80 mm) es ovoide u oblongo, con aspecto aplanado (Figura 13-A).

Presenta dos núcleos opuestos y en el citoplasma, contiene vacuolas alimenticias y la vacuola

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

contráctil; se moviliza por un movimiento monopodial y una superficie de la célula sin ninguna proyección sub-pseudopodial (Visvesvara, 2013).

Los quistes son redondos, miden entre 18 y 25 μm , de doble pared y tienen poros nucleares. Se destacan por ser bicelulares (Figura 13-B), como resultado del intercambio sexual entre dos trofozoítos, lo cual genera quistes binucleados unicelulares. Pueden albergar bacterias endosimbiontes en vacuolas citoplasmáticas. Los quistes pueden sobrevivir el paso por el estómago con su líquido gástrico, pero su presencia intestinal no es sinónimo de infección (Walochnik *et al.*, 2010; Trabelsi *et al.*, 2012).

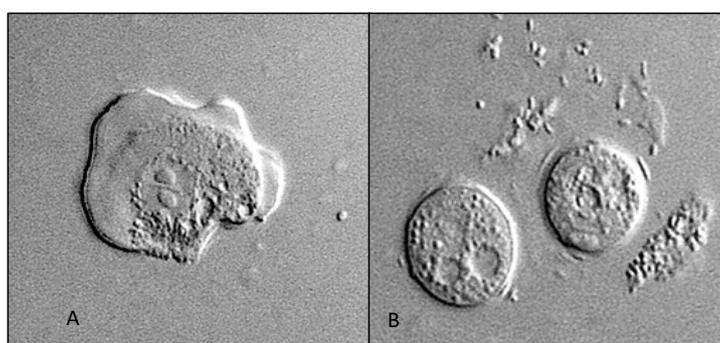


Figura 13: *Sappinia* sp. A. Trofozoíto. B. Quiste

Adaptado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>

4.4.3 Ciclo de vida y biología.

Sappinia, al igual que otras AVL, presenta un ciclo de vida con solo dos estadios, trofozoíto y quiste. Inicialmente, se supuso que *Sappinia* era coprozoica, ya que los primeros aislamientos fueron obtenidos a partir de estiércol animal. Sin embargo, *Sappinia* es considerada una ameba de vida libre típica ampliamente distribuida en el ambiente (Walochnik *et al.*, 2010). Page en 1976, describió a *S. pedata* sin etapa sexual pero con una etapa de división arrestada y suelen encontrarse

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

en suelos y estiércol de caballo, con una distribución en Europa y América del norte. Para *S. diploidea* en particular, se ha descrito reproducción sexual, aunque la fusión de núcleos nunca ha sido documentada de manera convincente y se ha encontrado en agua dulce, suelo, desechos forestales y heces de animales, con un área de distribución incluyendo Europa, América del norte, Egipto, Palestina, las Antillas y Japón (Walochnik *et al.*, 2010).

Sappinia se puede cultivar a temperatura ambiente en agar no nutritivo recubierto con bacterias como *Enterobacter cloacae*. Generalmente, necesitan de 3 a 10 días para mutiplicarse. El cultivo axénico hasta ahora no ha tenido éxito. Su crecimiento puede acelerarse mediante la adición de otras amebas diminutas indefinidas como posible fuente de alimento (Michel *et al.*, 2006; Trabelsi *et al.*, 2012).

Hasta 2001, *Sappinia* spp. no había demostrado ser letal en los seres humanos o en animales de experimentación ni implicada en patología alguna, cuando se informó de un caso de encefalitis causada por *S. diploidea*, el cual ocurrió en un hombre de 38 años, inmunocompetente quien sobrevivió a la infección (Gelman *et al.*, 2001; Gelman *et al.*, 2003). Una primera investigación molecular realizado casi 8 años después del hallazgo inicial indicó a una relación más estrecha de esta cepa a *S. pedata* (Qvarnstrom *et al.*, 2009; Walochnik *et al.*, 2010). Hasta la fecha, no se han informado de otros casos producidos por esta AVL.

4.5 Otras amebas de importancia en salud pública: *Vermamoeba vermiformis*, *Vahlkampfia* y *Paravahlkampfia*.

Las especies involucradas descritas hasta la fecha en patología humana, pertenecen a los Géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*; sin embargo, otros géneros como

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Vermamoeba (=Hartmannella) y *Vahlkhkampfia* se han considerado como importantes en la salud pública, bien como productoras de daño o por estar asociado y/o transmitir otros organismos patógenos (Centeno *et al.*, 1996; Lorenzo Morales *et al.*, 2007-b; Thomas y Greub, 2010).

El género *Hartmannella* spp. comprende varias especies: *Hartmannella abertawensis*, *agricola*, *cantabrigiensis*, *crumpae*, *hibernica*, *hialina*, *lobifera*, *vacuolata* y *vermiformis*, algunas de ellas termotolerantes, característica de las AVL con capacidad patogénica. *Hartmannella vermiformis* presentaba diferencias significativas con respecto al resto de especies del género, tanto a nivel morfológico como molecular. Para diferenciarla del resto de especies, se estableció un nuevo género denominado *Vermamoeba* y especie *vermiformis*, de la familia *Vermamoebidae* (Weekers *et al.*, 1994; Smirnov *et al.*, 2011).

A pesar de su inclusión en la lista de parásitos humanos y de ser informado su hallazgo en el líquido cerebroespinal de un paciente con meningoencefalitis y bronconeumonía (Centeno *et al.*, 1996; García, 1997), la capacidad patogénica de *Vermamoeba* en el humano ha sido controvertida (De Jonckheere y Brown 1998-a, 1998-b, 1998-c, 1999). No obstante, se han publicado numerosos reportes que sugieren su papel como agente patógeno directo, en casos de queratitis, asociada o no con otras AVL (Kennedy *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1996; Aimard *et al.*, 1998; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007-b; Abedkhozasteh *et al.*, 2013; Hajjalilo *et al.*, 2015); también se ha implicado en patología de forma indirecta, por su papel como hospedador para bacterias patógenas como *Legionella pneumophila*, el agente causal de la enfermedad de los legionarios (Fields *et al.*, 1990), *Pseudomonas*, importante patógeno ocular y en especial, de usuarios de lentes de contacto (Dini *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2013) y para *Mycobacterium chelonae*, bacteria patógena emergente (Cabello-Vilchez *et al.*, 2014).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

En cuanto a su morfología, **el trofozoíto** muestra una forma tubular (Figura 14-A), con una prominente zona hialina anterior, a veces puede observarse un polo uroide. Su longitud varía entre 14-31 μm , siendo esta medida seis veces mayor que su anchura (Page, 1967-a). Su citoplasma presenta con frecuencia pequeños cristales y puede observarse una vacuola contráctil. Su movimiento es constante, no-eruptivo, basado en la emisión de protuberancias hacia la dirección de avance con gran rapidez. Ninguna forma flagelada ha sido observada (Page 1967-a, 1988).

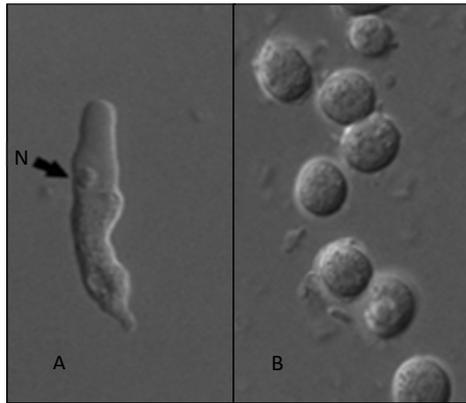


Figura 14. *Vermamoeba vermiformis*, A trofozoíto B: quistes. N: núcleo

Adaptado de: Park SJ, 2016

El quiste (Figura 14-B) suele ser pequeño, redondeado o ligeramente ovoide, con un solo núcleo, doble pared sin poros (Smirnov y Michel, 1999). *Vermamoeba vermiformis* puede encontrarse frecuentemente en agua dulce y suelo de ambientes diversos de todo el mundo (Solgi *et al.*, 2012; Dillon *et al.*, 2014; Park, 2016).

El género *Vahlkampfia* pertenece, a la familia *Vahlkampfiidae*, al igual que *Naegleria* spp.; en París, 1912, E. Chatton y P. Lalung-Bonnaire describieron a *Vahlkampfia* spp., aislada de las heces de un paciente con diarrea crónica, observando la ausencia de un estado flagelado. Así, se

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

agrupan en este género las especies de vahlkampfidios que no forman flagelados y que no tienen poros pre-formados en los quistes para el exquistamiento (Martínez y Visvesvara, 1997).

Las especies del género *Vahlkampfia* han sido reclasificadas en base al análisis de la secuencia del ADN de la sub-unidad pequeña ribosomal (ADNr *SSU*) (Brown y De Jonckheere, 1999). Las especies hasta ahora descritas son: *V. anaerobica* (Smirnov y Fenchel, 1996) *V. caledonica* (Anderson *et al.*, 1997) *V. calksinsi* (Hogue, 1914), *V. lobospinosa*, *V. dumnonica*, *V. longicauda* y *V. trilaminata* (Schmoller *et al.*, 1982).

En su ciclo de vida, los **trofozoítos** se dividen por fisión binaria y suelen ser pleomórficos, de diversos tamaños de acuerdo a la especie, uninucleados muy móviles, con un pseudópodo grande o bien, con expansiones ectoplasmáticas de diversos tamaños y formas, compuestas por citoplasma hialino de aspecto liso (Figura 15-A). Pueden observarse vacuolas digestivas y contráctiles, así como un polo uroide producido por la adhesión al sustrato (Page, 1967-a; González-Robles *et al.*, 2012). Los **quistes** son redondeados, de doble pared y pueden medir entre 7 y 20 μm (Figura 15-B); sin embargo, su estructura no es un dato suficiente para llegar a la identificación de *Vahlkampfia* (Page, 1976).

Al igual que otras AVL, *Vahlkampfia* es ubicua y cosmopolita en el ambiente: ha sido aislada de suelo, agua dulce y de mar y de aire, incluyendo suministros domésticos como aires acondicionados (Aitken *et al.*, 1996). El aislamiento de *Vahlkampfia* en cultivo es difícil, además de requerirse conocimiento y entrenamiento para su diferenciación con otras amebas como *Acanthamoeba*, en especial, durante el procesamiento de muestras provenientes de humanos en las que ambas AVL pueden coexistir (Arnalich-Montiel *et al.*, 2013)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

En relación con las infecciones en humanos, se han documentado dos casos de encefalitis, probablemente debido a *Vahlkampfia*, cuyo diagnóstico sólo se fundamentó en la apariencia morfológica de las amebas en el tejido (De Jonckheere y Brown, 1998-a). También se ha implicado en infecciones oftalmológicas de forma aislada (Alexandrakis *et al.*, 1998; Mahittikorn *et al.*, 2016) o asociada con otras AVL como *Acanthamoeba* (Niyatti *et al.*, 2010; Arnalich-Montiel *et al.*, 2013) y *Vermamoeba* (Hay *et al.*, 1996; Aitken *et al.*, 1996).



Figura 15. *Vahlkampfia* spp., A: trofozoitos B: quistes.

Adaptado de: De Jonckheere JF, 2017.

El género *Paravahlkampfia* fue creado en 1999, por Brown y De Jonckheere luego de una revisión filogenética detallada del género *Vahlkampfia*, en la cual la especie *V. ustiana* (Page, 1974), proveniente de una piscina en Checoslovaquia en 1968 (Cerva y Nova'k, 1968), fue incluida y renombrada en el nuevo género como *Paravahlkampfia ustiana* (Brown y De Jonckheere, 1999). La especie *P. ustiana* también ha sido aislada del intestino de lagartos (Schuster *et al.*, 2003), mientras que *P. lenta*, a partir de suelos (Brown y De Jonckheere, 2004; Schuster *et al.*, 2003).

Paravahlkampfia fue aislada por primera vez de muestras de humanos, en una infección mixta con el virus del *Herpes simplex* de la córnea de un paciente no usuario de lentes de contacto con queratitis (Ozkoc *et al.*, 2008). Visvesvara y colaboradores aislaron una ameba en el líquido

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

cefalorraquídeo (LCR), con características semejantes a *Paravahlkampfia* aunque con algunas diferencias morfológicas y fisiológicas, por lo que crearon una nueva especie: *P. francinae*, en honor a la Dra. Francine Marciano Cabral (Visvesvara *et al.*, 2009).

El género *Paravahlkampfia* spp. presenta dos estadios, trofozoíto y quiste, sin descripción hasta la fecha de formas flageladas (Figura 16-A, B). Los trofozoítos son semejantes a los descritos para la familia *Vahlkampfiidae*, pueden medir entre 15 y 35µm, con emisión de lobopodios eruptivos y un uroide discreto, cuando está presente. En el citoplasma, pueden observarse vacuolas digestivas y uno o dos núcleos (excepcionalmente), con un gran nucléolo. Los quistes pueden medir entre 5 y 20µm, redondeados o ligeramente ovales, con doble pared (eco y endoquiste) y el núcleo con las mismas características descritas para el trofozoíto (Ozkoc *et al.*, 2008; Visvesvara *et al.*, 2009).

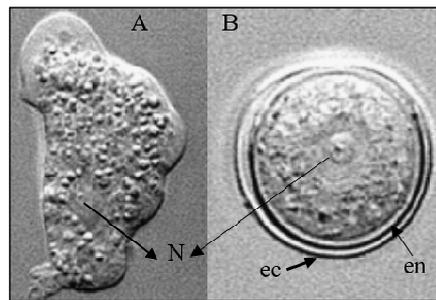


Figura 16. *Paravahlkampfia* spp., A: trofozoítos B: quistes.

Adaptado de: Visvesvara *et al.*, 2009

5. Enfermedades producidas por amebas de vida libre.

Las amebas de vida libre se describieron como agentes causales de patología en humanos desde 1948, cuando se documentó el primer caso de una amebiasis diseminada, posiblemente por *Naegleria* (Derrick, 1948); posteriormente y con la implementación de nuevas técnicas, se agregó

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

a la lista de AVL patógenas los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vahlkampfia*, *Paravahlkampfia* y *Vermamoeba*. El hallazgo de algunas amebas como *Sappinia*, que sólo habían sido observadas en muestras ambientales, plantea la posibilidad de que otras AVL consideradas sin importancia clínica, puedan ser potenciales patógenos humanos.

El diagnóstico de las infecciones por amebas de vida libre es complicado, debido a diversos factores: por ser infecciones infrecuentes, el personal médico y de laboratorio no están familiarizados con los síntomas ni con la identificación de estas amebas en las muestras clínicas. Las infecciones causadas por algunas de estas amebas suelen ser fatales, por lo cual, el diagnóstico se hace a menudo durante la autopsia, incluso en países desarrollados donde están disponibles instalaciones bien dotadas para el diagnóstico temprano y certero. Es muy posible que un gran número de casos pasen desapercibidos y por ello, la incidencia real de estas afecciones realmente está subestimada.

Es importante resaltar que la manipulación de las muestras para el aislamiento, diagnóstico y estudio de las AVL patógenas, bien sea de ambiente o de animales y humanos debe realizarse en laboratorios equipados de forma adecuada bajo los estándares pautados por el CDC de Atlanta (laboratorios BSL-3) y la normativa legal de cada país para los riesgos biológicos, tomando en consideración que las AVL patógenas son consideradas se consideran agentes biológicos del grupo de riesgo 2 (*Acanthamoeba* spp.) y 3 (*N. fowleri*, *B.mandrillaris*) (Real Decreto 664, 1997; CDC, 2012).

Con relación a las patologías producidas por las AVL, se resume que *N. fowleri* puede, bajo ciertas circunstancias, causar rápidamente una meningoencefalitis primaria, principalmente en niños y adultos jóvenes; algunas especies de *Acanthamoeba* y *B. mandrillaris* producen encefalitis

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

amebiana granulomatosa subaguda o crónica e infecciones de la piel y senos nasales, predominante en individuos inmunocomprometidos; *S. pedata* ha sido descrita en el único caso informado, como productora de una encefalitis necrosante, sin formación de granuloma Aunque las drogas pueden ser eficaces para el tratamiento de algunas de estas infecciones, aquellas que involucran el sistema nervioso central son típicamente fatales. *V. vermiformis*, *Vahlkampfia* spp. y *Paravahlkampfia* spp. han sido implicadas en infecciones oculares y algunos casos de encefalitis.

5.1 Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP): clínica, epidemiología y diagnóstico.

La MAP es una infección hemorrágica necrotizante aguda, casi siempre fulminante, ocasionada por *N. fowleri*, en individuos tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidos, con antecedentes de estar en contacto con aguas de lagos, piscinas o cuerpos de agua en donde la ameba se encuentre, en un periodo de 3-7 días previos a la aparición de los síntomas (Oddó, 2006). Las amebas pueden llegar hasta los conductos nasales en cualquiera de sus formas evolutivas (trofozoítos flagelados, ameboides o quistes), pero son los trofozoítos ameboides los que pueden adherirse a la mucosa nasal, migran a través de la placa cribiforme y llegan al cerebro por el neuroepitelio olfatorio, causando una necrosis grave en los lóbulos frontales del cerebro inicialmente, con posterior compromiso predominante de la base del cerebro, tronco cerebral y cerebelo (Figura 17-A). En las lesiones, los trofozoítos suelen ubicarse en el área perivascular, sin descripción hasta la fecha, de la presencia de formas quísticas (Marciano-Cabral y Cabral, 2007; Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2014).

El período de incubación oscila entre 2 y 15 días, con síntomas que aparecen abruptamente como fiebre leve, confusión, rinitis, odinofagia, los cuales progresan rápidamente, con acentuada cefalea y fiebre, seguido por vómitos, rigidez de nuca, convulsiones, signos de irritación meníngea

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

y coma. La enfermedad progresa rápidamente y debido a la demora en hacer un correcto diagnóstico por confusión con otras etiologías (bacteriana) y la instauración de tratamientos ineficaces para este organismo, el pronóstico para el paciente casi siempre es fatal (Visvesvara *et al.*, 2007; da Rocha Azevedo *et al.*, 2009). La causa de la muerte se debe principalmente al aumento de la presión intracraneal con herniación cerebral, lo que conlleva a un paro cardiopulmonar y edema pulmonar (Visvesvara *et al.*, 2007; da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009; Nicholls *et al.*, 2016).

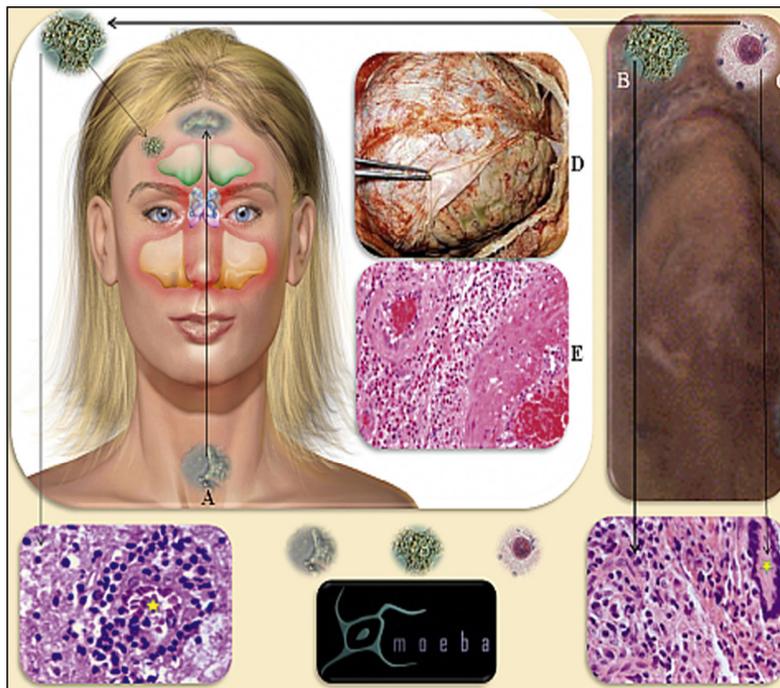


Figura 17. Ruta de infección y respuesta inmune contra *Naegleria fowleri* (A), *Acanthamoeba* spp., y *Balamuthia mandrillaris* (B y C, respectivamente). La presencia de células epitelioides y células gigantes (señaladas con estrellas amarillas) es característica de la lesión inflamatoria granulomatosa causada por *B. mandrillaris* y *Acanthamoeba* spp. Vista macroscópica (D) y microscópica (E) de la respuesta inflamatoria aguda generada por el organismo contra *N. fowleri*.

Tomado de: Baig, 2015

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Durante la década de los 1960, se logró evidenciar que *Naegleria* provocaba esta importante entidad clínica. En 1965, Malcolm Fowler y Rodney F. Carter en Adelaide (Australia) informaron los primeros 4 casos humanos de meningoencefalitis producidos por *N. fowleri*, y el término meningoencefalitis amebiana primaria fue acuñado por Cecyl G. Butt al hacer el respectivo reporte de un caso en Estados Unidos de América (E.U.A) en 1966. Se hicieron otras publicaciones posteriormente entre 1966 y 1968 sobre casos de MAP. Esta ameba patógena fue descrita entonces por Carter en 1970 como *Naegleria fowleri*, en honor a Fowler (Martínez y Visvesvara, 1997; De Jonckheere, 2014).

La incidencia mundial de MAP, al igual que otras afecciones por AVL, no se conoce con exactitud. Numerosos factores afectan la identificación precisa, incluyendo la falta de recursos o conocimientos en diagnóstico microbiológico; dar prioridad a la gestión de otras infecciones que son más comunes y creencias culturales que impiden las autopsias; el aumento de la temperatura del agua por calentamiento global, un saneamiento inadecuado, fuentes de agua contaminada y prácticas de ablución religiosa, aumentan el riesgo de adquirir una MAP (De Jonckheere, 2014).

La MAP ha sido informada en todo el mundo, con un mayor número de casos encontrados en Estados Unidos de América (E.U.A), Australia y algunos países europeos como Francia, con menos reportes en África y América del sur. El número de casos comunicado en la literatura permanece bajo, estimado alrededor de 250, hasta 2014 (De Jonckheere, 2014; Nicholls *et al.*, 2016). Los reportes provienen de todos los continentes excepto la Antártica (De Jonckheere, 2011) y aunque es una enfermedad poco frecuente, cada año se describen nuevos casos, de curso fatal en un 95%, especialmente en niños y personas jóvenes con aparente buen estado de salud (De Jonckheere, 2014; Nicholls *et al.*, 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

N. fowleri es un organismo termófilo y por lo tanto, estas amebas proliferan durante los meses de verano cuando la temperatura ambiental suele ser alta, sobre todo en zonas tropicales. Durante tales temporadas, hay confluencia de un gran número de personas dedicadas a las actividades recreacionales acuáticas (natación, buceo, esquí acuático, etc.) en lagos, estanques y otros sistemas de agua dulce caliente, además de piscinas inadecuadamente tratadas con cloro, lo que las expone al riesgo de una MAP (Visvesvara, 2010).

El diagnóstico de una MAP debe hacerse lo más pronto posible para la instauración temprana del tratamiento apropiado. Esto implica una metodología diversa, que incluye:

- Datos clínicos-epidemiológicos: antecedentes de inmersión o baños en cuerpos de aguas calientes; sintomatología semejante a una meningitis bacteriana (Visvesvara, 2010).
- Diagnóstico por imagen: la Resonancia Magnética (RM) y la Tomografía Computarizada (TC) permiten evidenciar las lesiones (Figura 17D, E), tales como la obliteración de las cisternas alrededor del cerebro mesencéfalo y del espacio subaracnoideo, pero no determinan la etiología parasitaria (Visvesvara, 2013)
- Diagnóstico parasitológico: de acuerdo a los resultados del estudio citoquímico del LCR, debe ser considerada la sospecha de una MAP si este líquido es turbio por aumento de células, con predominio de neutrófilos pero sin bacterias, glucosa disminuida y proteínas elevadas,. El examen microscópico directo del sedimento del LCR es el método de elección en el diagnóstico de MAP para la detección de amebas. Adicionalmente, se pueden realizar preparaciones fijadas para tinciones como Giemsa, Wright o hematoxilina-eosina (H&E), lo cual permitiría distinguir las amebas de otras

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

células presentes en el LCR, aunque las amebas suelen teñirse mal (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009; Visvesvara, 2010).

El sedimento del LCR, así como material de biopsia, pueden cultivarse en los medios recomendados internacionalmente para esta ameba, como el agar no nutritivo al 2%, con la adición de *Escherichia coli*. Para distinguir *N. fowleri* de otras amebas que puedan estar presentes en las muestras evaluadas, se puede emplear la prueba de la inducción de la flagelación, la cual es mejor realizar a partir de los cultivos, ya que se pueden obtener mayor cantidad de trofozoítos luego de su multiplicación (De Jonckheere, 2001).

- Diagnóstico inmunológico. El CDC de Atlanta emplea anticuerpos policlonales en conejos o anticuerpos monoclonales para identificar amebas en tejidos y en el LCR, mediante pruebas de inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). La valoración de los niveles de anticuerpos anti-*Naegleria* en el suero de los pacientes afectados no es de mucha utilidad para el diagnóstico, ya que los mismos han sido detectados en personas sanas y su aumento es de difícil discriminación por el curso agudo de la infección y su desenlace fatal (Visvesvara, 2010).

- Diagnóstico anatomopatológico. La observación histológica se realiza previa fijación del material de la biopsia en formalina al 10% y tinción con hematoxilina-eosina, inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009)

- Diagnóstico molecular. Las técnicas moleculares son las más adecuadas para el diagnóstico rápido de la MAP, pero no están disponibles en muchos de los laboratorios clínicos. Se ha empleado la PCR con alta especificidad y sensibilidad, así

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

como la PCR en tiempo real para la detección de *N. fowleri* en muestras ambientales y clínicas frescas y/o fijadas en formalina y, usando cebadores para la región completa del espaciador de transcripción interna ribosomal (ITS) que permite la discriminación de especies de *Naegleria*. Recientemente, Qvarnstrom y colaboradores, desarrollaron una PCR multiplex en tiempo real, usando sondas para detectar la longitud total o parcial de los genes de la subunidad ribosomal pequeña nuclear (gene del ARNr18S) para la detección simultánea de *N. fowleri*, *B. mandrillaris* y *Acanthamoeba* spp., por lo cual puede ser empleado con cualquier muestra en la que se sospeche la presencia de estas amebas (Qvarnstrom *et al.*, 2006; da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009; Nicholls *et al.*, 2016). Sin embargo, no es altamente sensible en muestras complejas y suele dar falsos positivos para *N. fowleri*.

5.2 Encefalitis granulomatosa amebiana por *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*: clínica, epidemiología y diagnóstico.

Es una enfermedad subaguda o crónica del sistema nervioso central (SNC), ocasionada por *Acanthamoeba* spp y *B. mandrillaris*, de carácter granulomatoso y evolución lenta, multifocal, con angeítis necrótica y presencia de algunas células macrofágicas y células gigantes multinucleadas (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Cuando es producida por *Acanthamoeba* spp, afecta principalmente a pacientes con deficiencias inmunológicas, tales como pacientes con VIH-SIDA, personas desnutridas, con tratamientos inmunosupresores, enfermedades crónicas debilitantes, niños pequeños y ancianos,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

mientras que, si el agente causal es *B. mandrillaris*, pueden verse afectados tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Los casos de EGA pueden ocurrir en cualquier momento del año y no tienen relación con la exposición a agua dulce (Visvesvara, 2013).

La encefalitis por AVL es relativamente rara, con un estimado de más de 200 casos en todo el mundo ocasionados por *Acanthamoeba* e igual estimación para los producidos por *B. mandrillaris*, probablemente debido a los mismos problemas en el reconocimiento de la etiología amebiana de los casos (Oddó, 2006; Trabelsi *et al.*, 2012; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013; Orrego-Puelles *et al.*, 2015). Para *Balamuthia*, el mayor número de pacientes infectados se han informado América, sobre todo en América del Norte y Latinoamérica, destacándose los reportes desde Perú; también existen algunos documentados en Asia, Australia y Europa: Reino Unido, Portugal la República Checa y Thailandia (Seas y Bravo, 2006; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013; Krasaelap *et al.*, 2013), mientras que en el continente africano, solo ha sido informado un caso posiblemente adquirido en Gambia (van der Beek *et al.*, 2015).

Acanthamoeba spp también causa infecciones del SNC en animales como gorilas, monos, perros, ovejas, ganado, caballos y canguros, así como aves, reptiles, anfibios, peces e incluso invertebrados (Visvesvara, 2013; Valladares *et al.*, 2014, 2015). *B. mandrillaris* también se ha diagnosticado igualmente en animales, incluyendo un caballo, una oveja, perros y más frecuente en primates (Trabelsi *et al.*, 2012; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Balamuthia y *Acanthamoeba* spp. penetran en el cuerpo a través de brechas o rupturas en las barreras mucocutáneas (Figura 17 B y C). La vía de entrada puede ser a través de piel, oído, tracto respiratorio superior, o incluso a través de catéteres de diálisis peritoneal, mediante el contacto con agua contaminada o polvo suspendido en el aire, no reportándose aún por contacto

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

con agua de piscinas recreativas (Visvesvara *et al.*, 2007). El trasplante de órganos se perfila como un nuevo modo de entrada, al trasplantarse órganos infectados al donante (Baig, 2015).

La infección por *Acanthamoeba* llega a ser evidente solamente después de varias semanas o incluso meses, por lo que generalmente se hace difícil identificar el foco primario. El período de incubación de la EGA por *B. mandrillaris* igualmente se desconoce, excepto en casos de infección post-trasplante y el curso de la infección puede durar hasta varias semanas a 2 años. Muchos casos desarrollan lesiones cutáneas o úlceras antes de la infección del SNC. Estas lesiones de piel pueden ocurrir en la cara, tronco y/o extremidades (Visvesvara, 2013; Baig, 2015).

La EGA (Figura 18) puede semejar una meningitis bacteriana, una meningitis tuberculosa o una viral. Inicialmente, los síntomas pueden incluir dolor de cabeza, rigidez de la nuca, fotofobia, náuseas y vómitos, febrícula y letargo. Posteriormente, pueden presentarse alteraciones visuales, parálisis del nervio facial, ataxia, convulsiones y hemiparesia, lo cual conlleva al coma y la muerte (Visvesvara *et al.*, 2007; Trabelsi *et al.*, 2012; Baig, 2015).

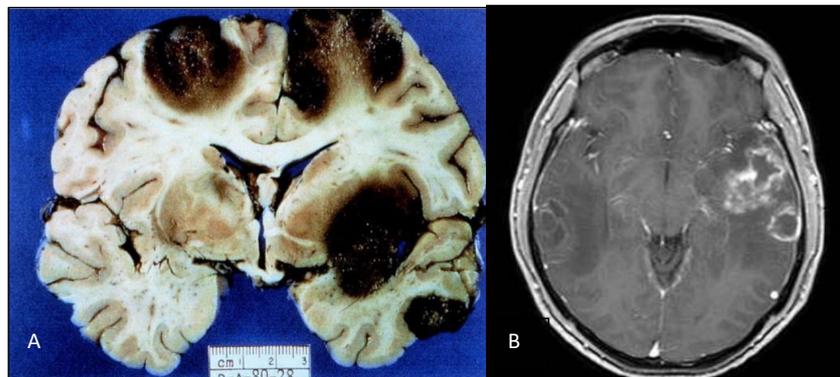


Figura 18. Encefalitis amebiana. A. Por *Acanthamoeba* (lesiones en corte de cerebro). B. Por *B.mandrillaris* (lesiones observadas por RM en lóbulo temporal y cerebelo)

Adaptado de: Marciano –Cabral y Cabral, 2003 y Orello-Puelles *et al.*, 2015

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Para el diagnóstico de una EGA y la identificación del agente causal, al igual que para *N. fowleri*, las manifestaciones clínicas no son específicas, por lo cual, se requiere de otros métodos:

- **Datos clínicos-epidemiológicos:** la sintomatología suele ser confusa, semejante a meningitis viral o bacteriana; el inmunocompromiso del paciente puede orientar el diagnóstico en algunos casos, no así en las personas inmunocompetentes.
- **Diagnóstico por Imagen:** en la Resonancia Magnética (RM) y la Tomografía Computarizada (TC) pueden observarse lesiones por ocupación de espacio, hipodensas, semejantes a hematomas, tumores o abscesos (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).
- **Diagnóstico de laboratorio parasitológico:** el estudio citoquímico del LCR no muestra mayores variaciones, solo una leve pleocitosis a expensas de los linfocitos, con valores de proteínas ligeramente elevados y glucosa normal. Ni el examen microscópico directo del sedimento del LCR ni las tinciones del mismo demuestran presencia de las amebas.

Para *B. mandrillaris*, se requieren cultivos celulares o bien, medios especiales como el sugerido por Lares-Jiménez y colaboradores en 2015, en laboratorios especializados tipo BSL-3.

- **Diagnóstico anatomopatológico:** los quistes/trofozoítos de *Acanthamoeba* y de *B. mandrillaris* pueden detectarse en el tejido cerebral mediante microscopía de luz y electrónica; se pueden utilizar tinciones histológicas, como la H&E, ácido peryódico de Schiff, metenammina de plata (Gomori-Grocott) y calcoflúor blanco, para la identificación de los quistes en biopsia de tejido (Castrillon y Orozco, 2013; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Es posible identificar a *B. mandrillaris* en biopsias con el uso de microscopía electrónica de transmisión (MET). A diferencia de las células del hospedador, los trofozoítos contienen un nucléolo denso característico y el citoplasma contiene numerosas vesículas. La MET puede distinguir *B. mandrillaris* de *Acanthamoeba*, puesto que *B. mandrillaris* posee un quiste de triple pared, un rasgo distintivo en comparación con la doble pared quística de *Acanthamoeba* (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

- Diagnóstico inmunológico: Actualmente, los métodos más precisos disponibles incluyen detección de amebas en el tejido, ya sea por inmunofluorescencia o por inmunoperoxidasa empleando suero de conejo con anticuerpos policlonales anti-*Acanthamoeba* y anti-*Balamuthia* dispuestos por el CDC-Atlanta, en tejido fijado (Castrillon y Orozco, 2013; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

La detección de elevación en los niveles de anticuerpos anti-*Acanthamoeba* es una herramienta útil para identificar casos de infección por esta ameba: mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), las personas infectadas muestran altos títulos de anticuerpos (entre 1: 256 y 1: 1024), mientras que en el suero de individuos sanos que han estado expuestos a *Acanthamoeba* en el medio ambiente, se detectan títulos de anticuerpos bajos, generalmente no mayores de 1:80 (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Al igual que *Acanthamoeba*, durante la infección por *B. mandrillaris* la concentración de anticuerpos específicos en el suero es elevada, por lo que, al usar ensayos como IFI y ELISA empleando los anticuerpos poli o monoclonales del CDC de Atlanta, es posible discriminar entre el contacto con el parásito y una infección, en los seres humanos (Schuster *et al.*, 2006-b, 2009; da Rocha *et al.*, 2009). La citometría de flujo también ha sido empleada con éxito para detectar y

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

cuantificar anticuerpos específicos contra *B. mandrillaris* en individuos sanos y enfermos (Kiderlen *et al.*, 2009).

- Diagnóstico molecular. La detección de *Acanthamoeba* con fines diagnósticos puede lograrse rápidamente mediante métodos moleculares hasta el nivel de género es suficiente. Esto puede realizarse mediante una PCR para la secuencia completa del ADN del gen 18S ARN ribosomal (18S ADNr) usando un par de cebadores específicos para el género *Acanthamoeba*, JDP1 y JDP2, obteniéndose un amplicon de 500 pb llamado ASA.S1 (Schroeder *et al.*, 2001). Además, esta PCR presenta la ventaja de identificar todos los subgrupos o genotipos del género. Para la detección de *B. mandrillaris*, se han desarrollado PCR basadas en la amplificación del gene del ARNr 16S mitocondrial (Booton *et al.*, 2003; Yagi *et al.*, 2005) y el gene P de ribonucleasa ARNasa (Kiderlen *et al.*, 2008, Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Igualmente, la PCR en tiempo real desarrollada por Qvarnstrom y colaboradores, tal como fue mencionado para el diagnóstico de MAP, es un triple ensayo que permite distinguir entre las AVL patógenas, *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp y *B. mandrillaris*, destacando que, para el caso de *Acanthamoeba*, detecta todos los genotipos (Qvarnstrom *et al.*, 2006).

La Encefalitis Amebiana producida por *Sappinia pedata* sólo ha sido descrita en un paciente inmunocompetente de 38 años de edad, de Texas- EUA, cuya biopsia reveló una inflamación necrosante y hemorrágica con trofozoítos de doble núcleo alrededor de los vasos sanguíneos, cuyo caracteres morfológicos estructurales y ultraestructurales fueron atribuidos a *S. diploidea* (Gelman *et al.*, 2001). En este caso, entre los síntomas de la infección cerebral causada por *Sappinia* incluyeron pérdida del conocimiento, convulsiones, náuseas, vómitos, dolor de cabeza bifrontal, fotofobia y visión borrosa durante 3 días. Se detectó una lesión única de 2 cm,

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

en el lóbulo temporal izquierdo posterior. El paciente sobrevivió, al ser tratado exitosamente durante más de 31 semanas con azitromicina, pentamidina intravenosa, itraconazol y flucitosina y con extirpación quirúrgica de la lesión necrótica. La ameba posteriormente fue identificada como *S. pedata*, mediante el uso de una PCR en tiempo real para secuencias del gene del ARNr 18S (Gelman *et al.*, 2001; Qvarnstrom *et al.*, 2009). El período de incubación y la ruta de la infección son desconocidos, pero probablemente ocurrió por inhalación a través de la nasofaringe y/o por diseminación hematogena hacia el cerebro (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Su diagnóstico se lleva a cabo, al igual que las demás AVL, mediante estudio de imágenes con RM o TC, en las que se puede observar un absceso sin pared, del cual puede obtenerse material de biopsia para realizar técnicas histológicas, histoquímicas y cultivo para la identificación de los trofozoítos. *Sappinia* puede ser diferenciada de otras AVL por la presencia de dos núcleos, apostados estrechamente en un eje central. *Sappinia* puede cultivarse en los medios convencionales como el agar no nutritivo al 2% con bacterias o cultivos celulares. Tanto *S. pedata* como *S. diploidea* pueden ser identificadas por métodos moleculares mediante la amplificación de la SSU ADNr, usando cebadores universales para SSU de eucariotas, seguido por otra PCR para el espaciador transcrito interno, empleando los cebadores ITS1-P1F y ITS2-P4R (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

5.3 Queratitis amebiana, queratoconjuntivitis y úlceras corneales: clínica, epidemiología y diagnóstico.

En pacientes inmunocompetentes, *Acanthamoeba* spp. puede producir queratitis (QA) y úlceras corneales (UC); se han descrito varias especies como agentes causales de estos cuadros, destacándose entre ellas las pertenecientes a los genotipos T4 (Marciano-Cabral y Cabral, 2003;

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Otros genotipos se han informado como productores de patología ocular, como el T3 (Omaña-Molina *et al.*, 2016), el T5 (Spanakos *et al.*, 2006) o el T11 (Lorenzo-Morales *et al.*, 2011). También se han documentado casos de queratitis debidas a coinfecciones entre *Acanthamoeba* spp. con *Vahlkampfia* (Niyati *et al.*, 2010, Arnalich-Montiel *et al.*, 2013) y con *V. vermiformis* (Lorenzo-Morales *et al.*, 2007-b), así como a estas dos AVL, sin estar acompañadas de otros patógenos (Kennedy *et al.*, 1995; Aitken *et al.* 1996; Hay *et al.*, 1996; Niyatti *et al.*, 2010; Abedkhozasteh *et al.*, 2013; Hajjalilo *et al.*, 2015).

La queratitis amebiana corresponde a un proceso inflamatorio agudo que afecta la córnea y con menos frecuencia, la conjuntiva y otras estructuras oculares, asociado al antecedente de un traumatismo corneal, uso de lentes de contacto y la exposición a agua o soluciones acuosas contaminadas con las formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Trabelsi *et al.*, 2012; Bouchoucha *et al.*, 2016). Los síntomas más frecuentes incluyen: ojos rojos, lagrimeo constante y edema palpebral y aunque usualmente afecta a un solo ojo, se han reportado lesiones bilaterales. Inicialmente las amebas se restringen al epitelio corneal con erosión del mismo, pudiendo desarrollarse la presencia de un infiltrado estromal en forma de anillo (Figura 19), que se presenta en más de dos tercios de los individuos afectados (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). La distribución radial perineural de la infiltración (keratoneuritis radial) es característica. Por su presentación clínica, puede ser confundida con las queratitis producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y por herpes (da Rocha- Azevedo *et al.*, 2009; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

La queratitis amebiana ha sido reportada en más de 3.000 individuos inmunocompetentes hasta la fecha. El desarrollo y uso extensivo de lentes de contacto desde 1980, aunado a la falta de cuidados en su mantenimiento y de agentes antimicrobianos efectivos para su tratamiento, ha resultado en el aumento de la incidencia de casos de queratitis por *Acanthamoeba* (Castrillón y

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Orozco, 2013; dos Santos *et al.*, 2016). En los últimos años ha aumentado el número de casos de QA en los países desarrollados por el número creciente de portadores de lentes de contacto. El número estimado de QA es de 1,36 casos por millón de usuarios de lentes de contacto en los Estados Unidos, contra 17 - 21 casos por millón en Inglaterra, mientras que en Francia reporta una tasa de 1 caso por cada 30.000 usuarios de lentes de contacto, con una incidencia en aumento constante (Seal, 2003; Trabelsi *et al.*, 2012; Anane *et al.*, 2016). Sin embargo, la QA aún se considera como una enfermedad rara, incluida en la base de datos ORPHANET (Portal Europeo de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos), con una prevalencia estimada de 1-9/100,000 (ORPHA67043; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

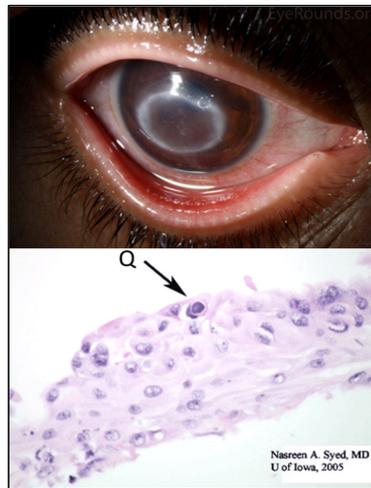


Figura 19. Queratitis por *Acanthamoeba* spp. Q: quistes en epitelio corneal.

Adaptado de: <http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/atlas/pages/acanthamoeba/index.htm#pathology>

Al igual que para la EGA, el diagnóstico de una QA se realiza mediante examen microscópico y cultivo de raspado corneal y las lentes de contacto, para el aislamiento e identificación de las amebas. La microscopia confocal *in vivo* de la córnea puede ser un método

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

útil y no invasivo para el diagnóstico, donde los quistes pueden observarse por la refracción de su doble pared, no así los trofozoítos, los cuales son difíciles de distinguir de los leucocitos y de los núcleos de los queratocitos (Lorenzo Morales *et al.*, 2015); sin embargo su sensibilidad y especificidad puede variar de acuerdo al entrenamiento adecuado y experiencia del personal médico a cargo de la evaluación de las imágenes (Villani *et al.*, 2014).

La PCR para la secuencia completa del ADN del gen 18S ARN ribosomal (18S ADN_r) con los cebadores JDP1 y JDP2 para *Acanthamoeba*, ha sido mayormente empleada por su alta sensibilidad en comparación con el cultivo (Schroeder *et al.*, 2001). La PCR multiplex en tiempo real establecido por Qvarnstrom *et al.*, 2006, puede aplicarse como *singleplex* para los casos de QA por *Acanthamoeba* (Lorenzo Morales *et al.*, 2015).

Para el diagnóstico de otras amebas implicadas en infecciones oculares como *Vahlkampfia* y *V. vermiformis*, se puede emplear la amplificación por PCR del gen FLA 18S ADN_r (ASA S1) con un par de cebadores universales para AVL denominados FLA-F y FLA-R y posterior secuenciación (Tsvetkova *et al.*, 2004; Smirnov *et al.*, 2011), así como una PCR en tiempo real para la búsqueda de *V. vermiformis* en agua (Kuiper *et al.*, 2016).

En caso de personas asintomáticas usuarias de lentes de contacto, es importante resaltar que las amebas pueden colonizar las lentes pero no invadir la córnea, por lo que el hallazgo de las amebas en dichas lentillas no es equivalente a una QA (Trabelsi *et al.*, 2012). Recientemente, fue encontrada *B. mandrillaris* en el líquido de limpieza contenido en la caja de las lentes de contacto de un paciente con una queratitis de origen desconocido en Alemania, lo cual plantea una posible nueva forma de contacto del parásito con el humano, aun cuando no pudo demostrarse si el hallazgo fue una contaminación o si realmente la ameba estaba presente en la caja (Balczun y Scheid, 2016).

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

5.4 Lesiones cutáneas por *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*: clínica, epidemiología y diagnóstico.

No se conoce aún si las lesiones cutáneas producidas por *Acanthamoeba* spp. representan un foco primario de infección o son el resultado de una diseminación hematogena a partir de otras ubicaciones tales como el tracto respiratorio, senos paranasales o SNC (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Se presentan tanto en individuos sanos como inmunocomprometidos, siendo estos últimos los más afectados y corresponden a procesos inflamatorios que afectan a la epidermis, dermis e hipodermis como nódulos, pápulas, pústulas o ulceraciones de la piel (Figura 20), con la formación de granulomas maduros bien constituidos o bien formaciones granulomatoides, con células gigantes, con presencia de quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Oddó, 2006). Hay cierto grado de necrosis, en especial, en las lesiones ulceradas y extensas, particularmente en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. El número de parásitos puede ser escaso, lo que dificulta su hallazgo o en otros casos, o abundantes con numerosos quistes asociados a granulomas (Oddó, 2006).



Figura 20. Lesiones cutáneas producidas por *Acanthamoeba* spp. en miembro inferior.
Tomado de: McKellar *et al.*, 2006

61

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Las zonas más afectadas por las lesiones son la cara, tórax y extremidades. En la forma diseminada de la infección, se ha observado compromiso del SNC, piel, pulmón, riñón, próstata y útero, con un cuadro histológico semejante al descrito previamente. Otras localizaciones aisladas inusuales han correspondido a hueso, senos paranasales y oído (Trabelsi *et al.*, 2012). En niños que han tenido EGA por *B. mandrillaris*, se han descrito lesiones de piel faciales o rinitis con infecciones de las cavidades sinusales y otitis media. (Figura 21). Las lesiones pueden ocurrir en el centro de la cara, manos, pies y tronco, acompañado de rinitis, antes de la implicación del SNC (Visvesvara, 2010). En los cuadros de dermatitis por *B. mandrillaris* no se observan quistes y el número de trofozoítos en la piel afectada es escaso (Oddó, 2006; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013; Cabello-Vilchez, 2015).



Figura 21. Lesiones centro-faciales de pacientes peruanos que desarrollaron encefalitis fatal

Tomado de: Cabello-Vilchez, 2015

El diagnóstico puede ser realizado mediante el estudio histológico, cultivo y técnicas moleculares del material de biopsia de las lesiones sospechosas, para evidenciar la presencia de trofozoítos amebianos y quistes, según el caso, junto con un infiltrado de células inflamatorias

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

mixtas. La detección temprana de las amebas en estas lesiones, aunada a un tratamiento precoz, previene la posible diseminación de las amebas al SNC y otros órganos, mejorando el pronóstico de los individuos afectados (Oddó *et al.*, 2006).

6. Tratamiento de las infecciones por Amebas de Vida Libre.

Las infecciones del SNC causadas por las AVL son difíciles de tratar debido a la inespecificidad de los síntomas, la escasa disponibilidad de pruebas diagnósticas confiables y a la inexperiencia del personal médico en relación con estas infecciones. Por otra parte, hay que tomar en cuenta factores inherentes a las drogas y sus vías de aplicación, como: la permeabilidad selectiva de la barrera hematoencefálica; la concentración mínima inhibitoria de la droga y la dilución previa de la misma al ser administrada por vía sanguínea o intratecal; las condiciones médicas del paciente y la paciente tolerancia y susceptibilidad de los organismos patógenos a los agentes amebicidas (Khan *et al.*, 2017).

La terapia para la **MAP** es complicada, debido a la naturaleza aguda y fatal de la infección, en un corto período de tiempo que genera una tasa de supervivencia baja. En los pocos casos de sobrevivientes, los tratamientos han sido muy agresivos, usando anfotericina B y miconazol o fluconazol intravenosa e intratecal, junto a rifampicina oral, con o sin esteroides (Seidel *et al.*, 1982; Dunn *et al.*, 2016). Por la alta toxicidad renal de la anfotericina B, se han evaluado *in vitro* e *in vivo* otras opciones, como los compuestos de fenotiazina: clorpromazina y trifluoperazina (Schuster y Visvesvara, 2004-c), algunos macrólidos como la azitromicina (Goswick y Brenner, 2003) y el compuesto triazol: voriconazol, en bajas concentraciones (Schuster *et al.*, 2006-a).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Para la EGA producida por *Acanthamoeba*, muchos de los casos son diagnosticados *post-mortem*, sin embargo, en aquellos con diagnóstico *ante-mortem*, especialmente en casos donde se ha producido una infección mucocutánea, el tratamiento con una combinación de antimicrobianos que incluyen pentamidina, fluconazol, flucitosina (5-fluorocitosina) y sulfadiazina ha sido exitosa y los pacientes han sobrevivido (Slater *et al.*, 1994; Visvesvara, 2013; Kulsoom *et al.*, 2014). Otro fármaco, la miltefosina, un hexadecilfosfolina, se ha utilizado con éxito en un caso de EGA por *Acanthamoeba* (Aichelburg *et al.*, 2008), así como su combinación con voriconazol (Webster *et al.*, 2012).

En la actualidad, no existe un régimen de fármaco único que se recomienda para casos de EGA ocasionada por *B. mandrillaris* en todo el mundo, y por lo tanto, su pronóstico es todavía pobre con un alta tasa de mortalidad del 98% (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013). Las recomendaciones sobre los antimicrobianos se basan sólo en pruebas *in vitro* de la actividad contra cepas de *Balamuthia mandrillaris* o a su uso en casos de infecciones humanas informadas. El tratamiento en la mayoría de los casos consiste en una combinación de antimicrobianos, incluyendo Isetionato de pentamidina, flucitosina (5-fluorocytosina), claritromicina, fluconazol y sulfadiazina (Deetz *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004; Cary *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2011). Otras opciones empleadas son el albendazol e itraconazol más escisión quirúrgica (Bravo *et al.*, 2011; Bravo y Seas, 2012), así como la miltefosina (Martínez *et al.*, 2010).

La duración exacta necesaria para tratar completamente un absceso amebiano cerebral, es incierta, ya que no hay marcadores bioquímicos validados de respuesta al tratamiento, por lo que puede ser desde meses hasta 5 años, dependiendo de los posibles efectos secundarios producto de la toxicidad de los compuestos (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

El uso de gluconato de clorhexidina y ketoconazol en crema para aplicación tópica para casos de **infección cutánea** por *Acanthamoeba* sin la implicación del CNS ha dado buenos resultados terapéuticos (Martínez, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Schuster y Visvesvara, 2004-c; Khan, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007). Además el voriconazol, un compuesto de triazol, fue utilizado en un paciente de trasplante de pulmón con acantamebiasis cutánea sin la implicación del SNC (Walia *et al.*, 2007).

Para la **QA**, al igual que otras afecciones por AVL, no se ha descrito hasta la fecha la eficacia de un solo tratamiento, ya que en la misma participan diversos factores independientemente de la cepa o genotipo causal de la patología, tales como el grado de virulencia de los aislados y la naturaleza fluctuante de la infección (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015,2016).

Los tratamientos actuales para la QA son los agentes tópicos, combinados, que actúen contra trofozoítos y quistes a la vez, por la naturaleza resistente a la terapia de esta última forma evolutiva. Los agentes tópicos más efectivos utilizados actualmente contra trofozoítos y quistes son las biguanidas (polihexametilen biguanida) y el clorhidrato de clorhexidina (Lim *et al.*, 2008; Lorenzo-Morales *et al.*, 2008; Roberts y Henríquez, 2010; Martín-Navarro *et al.*, 2013), combinadas o no con otros compuestos como diamidinas aromáticas como el isetionato de propamidina 0.1% (Brolene® Sanofi, Reino Unido), dibromopropamidina 0.15%, hexamidine 0.1% (Desomedine® Chauvin, Francia) y neomicina, con gran efectividad sobretodo en infecciones tempranas (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015,2016; Carrijo-Carvalho *et al.*, 2017).

Como alternativa ante el fracaso de los tratamientos tópicos, se emplea una combinación de debridamiento y queratoplastia penetrante con buenos resultados para algunos casos (Visvesvara, 2013). Actualmente, se están evaluando otras opciones terapéuticas como el voriconazol (Schuster *et al.*, 2006-a; Martín-Navarro *et al.*, 2015), las alquilfosfolinas como la

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

miltefosina con buenos resultados, (Walochnik *et al.*, 2002, Polat *et al.*, 2012, 2014), así como las estatinas (Martín-Navarro *et al.*, 2013, 2015).

7. Las Amebas de Vida Libre en Venezuela.

La República Bolivariana de Venezuela es un país situado en la parte septentrional de América del Sur, en las coordenadas 10° 30' 0" N, 66° 56' 0" W. Posee una extensión territorial de 916 445 km². El territorio continental limita al norte con el mar Caribe y el océano Atlántico, al oeste con Colombia, al sur con Brasil y por el este con Guyana (Figura 22). La ubicación de Venezuela al norte de Suramérica le permite disponer de un clima tropical benigno con precipitaciones puntuales y pisos térmicos variables entre tropical y gélido, con temperaturas en un espectro entre 0°C y 40°C (Organización de las Naciones Unidas & CAF, 2006; Instituto Nacional de Estadística, 2011-a).

El país está conformado por 23 Estados, un Distrito Capital, donde se asienta la capital del país: Caracas; 235 islas y 71 islotes y cayos en el Mar Caribe que conforman las Dependencias Federales. Posee una economía basada primordialmente en la extracción y refinación del petróleo y otros minerales, así como actividades agropecuarias e industriales. Se le reconoce también por ser uno de los 17 países mega diversos, con una geografía irregular que combina regiones áridas, selva, extensas sabanas en los Llanos y ambientes andinos. Su población se estima en 31. 028. 637 de habitantes para el 2016 y es ampliamente diversa, porque integra etnias europeas y mestizas, y en menor grado, amerindias, africanas y asiáticas (Instituto Nacional de Estadística, 2011-a)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Por estar ubicado en la región tropical, la población de Venezuela adolece de diversas enfermedades infecciosas típicas de esta zona del mundo, entre las que destacan principalmente, la malaria, la leishmaniosis, enfermedad de Chagas, las parasitosis intestinales y las infecciones virales como dengue, chikungunya y zika.

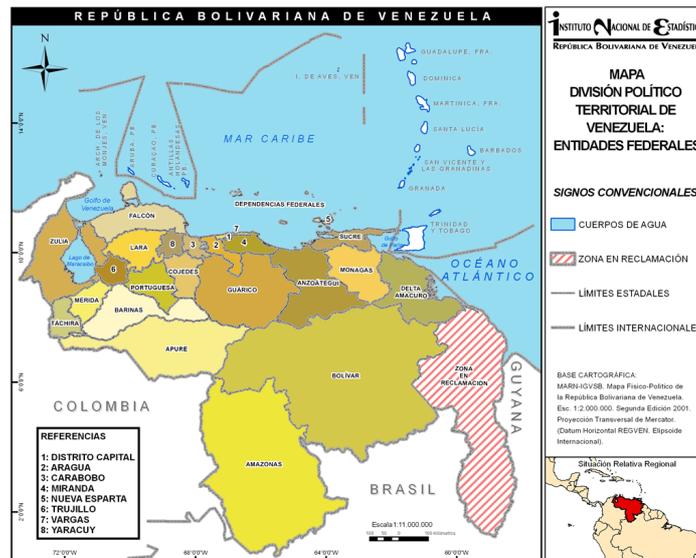


Figura 22. Mapa político territorial de la República Bolivariana de Venezuela.

Tomado de : Instituto Nacional de Estadística, 2011-a.

En relación con las AVL en Venezuela, al igual que en el resto del mundo, hay pocos datos sobre la verdadera prevalencia de las infecciones producidas por las AVL patógenas y de la presencia de AVL en el ambiente. No obstante, hay registro de varias publicaciones y otros trabajos no informados al respecto.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

El primer caso reportado de una MAP en Venezuela data de 1972 (Brass K, 1972; Willaert, 1974) y desde entonces se han informado en la literatura 5 casos más (Sánchez *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.* 1998; Petit *et al.*, 2006; Cermeño *et al.*, 2006; Ávila *et al.*, 2006). La baja incidencia mundial de esta afección, aunada a la inexperiencia de los clínicos para sospechar la etiología parasitaria del cuadro y de la rápida y mortal evolución de la infección, impide que se tenga un valor real de la prevalencia de esta parasitosis.

Cabe resaltar que en los reportes clínicos enumerados con anterioridad, no se logró el aislamiento de las amebas, sólo se menciona la observación de los trofozoítos por histopatología y solo algunos reportaron morfología sospechosa en muestras de líquido cefalorraquídeo o estudios *post mortem* con inmunofluorescencia. Los únicos datos previos con aislamiento y/o confirmación del agente patógeno en Venezuela provienen del Laboratorio de Amibiasis, adscrito a la Cátedra de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis/Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Desde el año 1984, este Laboratorio comenzó a llevar la línea de investigación sobre amebas de vida libre hasta la actualidad, donde se han diagnosticado *post-mortem*, tres casos de MAP, en los que se logró aislar e identificar a *Naegleria fowleri* como responsable de los cuadros, por morfología, prueba de flagelación y amplificación de ADN por PCR (Pérez de Galindo *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). A pesar que se desconoce el/los factor/es predisponente/s, se ha descrito que algunos de estos pacientes nadaron en piscinas, charcas o que a menudo frecuentaban zonas áridas/con tierras/polvo de Venezuela (Pérez de Galindo *et al.*, 2012).

Al igual que ocurre con la MAP, los registros de casos de EGA producidas por *Acanthamoeba* en Venezuela son escasos, considerando solo los informados por Willaert *et al.*, 1976, García-Tamayo *et al.*, 1980, García *et al.*, 1997, en los cuales los parásitos fueron detectados *post-mortem* sin aislamiento de la ameba y el reporte de Wagner *et al.*, 2011, en el cual se aisló e

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

identificó, *ante-mortem*, *Acanthamoeba* como agente productor de la EGA en un paciente inmunocomprometido.

La infección por *Balamuthia mandrillaris* ha sido descrita en forma creciente en el mundo y en Latinoamérica (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013). En Venezuela, los casos hasta ahora reportados han sido diagnosticados mediante características clínicas y técnicas histológicas (González-Alfonzo *et al.*, 1991, Martínez *et al.* 1994; Rodríguez *et al.*, 1998). En el Laboratorio de Amibiasis-UCV, se han procesado algunas muestras provenientes de piel de casos sospechosos, pero hasta el momento, no fue posible aislar al parásito ni evaluar las muestras por técnicas de PCR.

En Venezuela, no se conoce bien la frecuencia de las infecciones oftalmológicas ocasionadas por *Acanthamoeba* spp. Entre 1991 y 1992, se estudiaron 50 pacientes provenientes del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas, encontrándose un 6% de prevalencia de *Acanthamoeba* spp en pacientes con úlceras corneales y un 2% en usuarios de lentes de contacto con síntomas oftalmológicos (Bermúdez *et al.*, 1993; Díaz y Bermúdez, 1993; Bermúdez *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2003).

En el Laboratorio de Amibiasis, de 273 pacientes con afecciones oculares evaluados desde 1992 hasta 2005, se aisló *Acanthamoeba* spp en 25 de estos: 13 (30,23%) con úlceras corneales, 1 (2,33%) con queratitis, 4 (9,3%) con conjuntivitis. Además, se hizo el hallazgo en 7 (16,28%) lentes de contacto y/o líquidos de limpieza de los mismos, que fueron examinados para la investigación de estas amebas (Pérez de Galindo *et al.*, 2012). La identificación de *Acanthamoeba* en todos los casos fue realizada mediante morfología y pruebas biológicas (termotolerancia, curvas de crecimiento), con lo cual, la identificación hasta género, permitió la instauración de tratamiento para aquellos individuos que presentaron sintomatología ocular y además, mantener los aislados *in vitro* hasta la actualidad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Recientemente, de estos aislados, se evaluaron 24 cepas de *Acanthamoeba*, por morfología y técnicas moleculares (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción: RFLP-PCR), para conocer las especies que se encuentran en Venezuela. La identificación de las especies mediante RFLP se logró en un 33% del total de los aislados seleccionados, siendo *A. castellani* y *A. polyphaga* las especies encontradas. Para el resto de los aislados no fue posible la identificación de la especie mediante la RFLP-PCR, por diversas razones. Por ello, se propuso a futuro la evaluación de los aislados para la determinación de los genotipos y su relación con la patogenicidad de los mismos (Galindo *et al.*, 2016).

Tal como ocurre con las infecciones en humanos, la prevalencia de las AVL en el ambiente es prácticamente desconocida en Venezuela. Los pocos estudios que señalan la presencia de AVL patógenas en el ambiente se han realizado en aguas termales de uso público en el estado Trujillo (Moreno *et al.*, 1991) y de otras localidades de la región central del país (Laboratorio de Amibiasis, datos no publicados), además de los informados por Cermeño *et al.*, 2006 y Ávila *et al.*, 2006, donde evaluaron muestras de fuentes de agua relacionadas con dos pacientes que fallecieron por MAP en los estados Anzoátegui y Aragua. En los demás reportes de casos de MAP y EGA ya citados anteriormente, no se llegó a la investigación del origen ambiental de la infección y solo se mencionan, en algunos de ellos, la procedencia geográfica de los pacientes.

7.1 Estado actual del tema. Hipótesis.

Hasta ahora, los estudios que se han llevado a cabo en Venezuela, así como los casos informados de infecciones por AVL, están limitados a estudios de tipo descripción morfológica, clínico y anatomopatológico, sin búsqueda activa de casos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Por lo tanto, y debido a la alta tasa de fatalidad de los casos por AVL en Venezuela, se requieren estudios encaminados a la búsqueda, aislamiento, caracterización molecular (genotipado) y quimioterapia de AVL en este país.

Por lo tanto, en este proyecto de Tesis Doctoral, se ha planteado inicialmente la búsqueda de AVL en muestras ambientales de Venezuela. Además de la caracterización molecular de aislados clínicos, mantenidos en la Universidad Central de Venezuela.

Actualmente, no existe una política sanitaria referida a la búsqueda de AVL con grado de normativa legal, debido a que los clínicos no están familiarizados con estas entidades clínicas y su frecuencia es aún muy baja, aunque como ya se ha mencionado, hay que destacar la alta tasa de mortalidad existente. Muchos casos pasan desapercibidos por su confusión con enfermedades tumorales endocraneales o encefalitis no identificadas, debido a la falta de pruebas diagnósticas efectivas para AVL.

Se hace necesario, por lo tanto, la implementación de pruebas diagnósticas no invasivas en un futuro inmediato. El desarrollo de la biología molecular es una herramienta que ha avanzado enormemente en los últimos años en el desarrollo de diagnósticos clínicos para entidades de difícil identificación como es el caso de las AVL.

En esta línea, se ha avanzado en identificar *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris* tanto de muestras humanas como en el medio ambiente (Niyiyati *et al.*, 2009; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013, 2015). Finalmente, cabe destacar que este estudio aportará datos significativamente importantes en la identificación y características patogénicas de las amebas de vida libre en Venezuela.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Introducción

Partiendo de estas conclusiones, se podría sospechar como hipótesis que las poblaciones que habitan zonas del sur y del oriente de Venezuela, podrían estar colonizadas por AVL, entre ellas *Acanthamoeba*. Esta hipótesis y las condiciones geográficas de estas regiones serian ideales para un estudio sobre la colonización de AVL en individuos, ya que hasta la fecha nunca se ha realizado una búsqueda activa de las mismas en Venezuela, así como de los nichos ecológicos de las mismas (aguas, tierras).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



OBJETIVOS

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”.

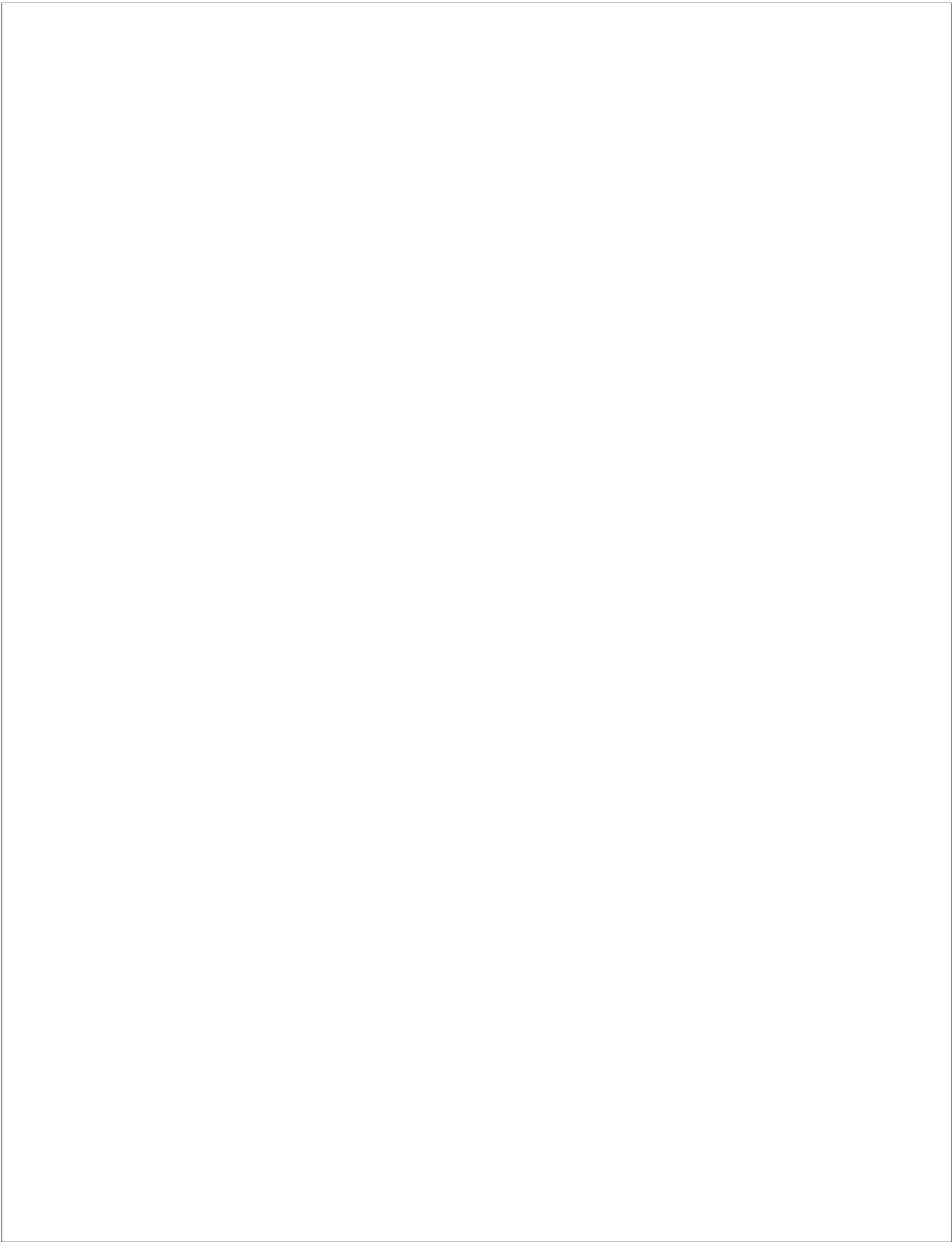
Albert Szent-Györgyi

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

OBJETIVOS

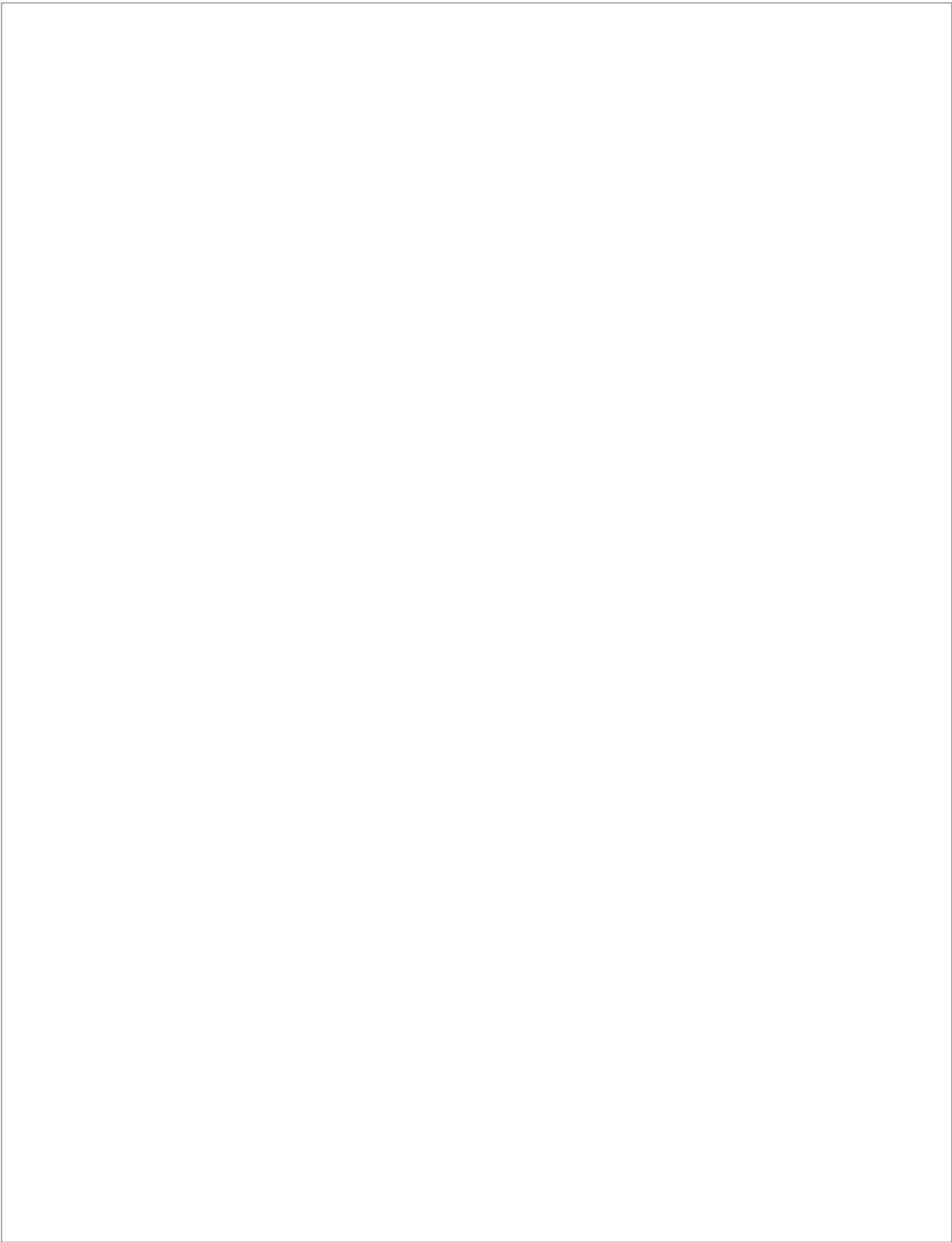
1.- Identificar y caracterizar a nivel molecular cepas de amebas de vida libre procedentes de muestras clínicas de Venezuela.

2.- Caracterizar el potencial patogénico de amebas de vida libre en muestras clínicas de Venezuela.

3.- Aislar y establecer los genotipos de *Acanthamoeba* y otras AVL en muestras ambientales (suelo) de Venezuela.

4.- Aislar y caracterizar a nivel molecular, un aislado de *Naegleria fowleri*, obtenido de una fuente doméstica y su asociación a un caso fatal de meningoencefalitis amebiana primaria.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



MATERIAL Y METODOS

“El esfuerzo y coraje no son suficientes sin propósito y dirección”.

John F. Kennedy.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

MATERIAL Y METODOS

1. Material.

1.1. Soluciones, reactivos y tampones.

- Kit de PCR AmpONE™ (GeneAll): Taq polimerasa, buffer de reacción 10x con 25 uM de Mg⁺², deoxynucleotidos trifosfatos (dNTPs).
- Kit de purificación y extracción de ADN Maxwell® 16, según el manual N° TM284 (Promega).
- Cebadores universales para AVL, FLA-F y FLA-R (Smirnov *et al.* 2011)
- Cebadores para Género *Acanthamoeba* (Schroeder *et al.*, 2001)
- Cebadores para *Balamuthia mandrillaris* (Booton *et al.*, 2003)
- Kit de purificación de PCR Qiaquick (Qiagen, Hilden, Germany)
- ADN de *Acanthamoeba castellani* Neff, *American Type Culture Collection* (ATCC) 30010.
- ADN de *Naegleria fowleri* ATCC 30894.
- ADN de *Balamuthia mandrillaris* (aislado proveniente de colección de cultivos del Laboratorio de Amebas de Vida Libre-IUETSPC-ULL).
- Solución de tinción de Ácidos Nucleicos REALSAFE (Durviz, Madrid, Spain).

1.2. Medios de cultivo.

ANN (Agar No Nutritivo).

- Bacto™ Agar (Difco, BD)..... 20g
- Agregar agua destilada hasta completar 1000ml

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

Autoclavar 121°C durante 25 minutos. Verter unos 15ml en placas de Petri en esterilidad, hasta su solidificación. Guardar a 4°C, protegido de la humedad.

ANN + Manitol 0.5M y 1M

- Bacto™ Agar (Difco, BD).....20g
- Manitol: 91,1 g para 0.5M y 182.2g para 1M
- Agregar agua destilada hasta completar 1000ml

Autoclavar 121°C durante 25 minutos. Verter unos 15ml en placas de Petri en esterilidad, hasta su solidificación. Guardar a 4°C, protegido de la humedad.

PAS (*Page's Amoeba Saline Solution*, ATCC 1323).

Solución 1:

KH₂PO₄0.136g
Agua destilada500ml

Solución 2:

MgSO₄ . 7H₂O 4.0mg
CaCl₂ . 2H₂O..... 4.0mg
NaCl 0.120g

Autoclavar por separado a 121°C por 25 minutos y dejar enfriar bien antes de mezclar ambas soluciones. Mantener refrigerado a 4°C para su conservación.

Tampón TAE 50X:

Tris Base (PM: 121.1gr/mol)...242 gr
Ácido acético glacial.....57,1 ml
EDTA 0.5 M.....100 ml

Completar con H₂O hasta 1 L.

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

1.3. Equipamiento.

- Balanza analítica Ax224 (Sartorius)
- Destilador de agua MilliQ filtro 0.22µm (Q-Gard)
- Refrigerador 4°C y -20°C (Liebherr)
- Campana de flujo laminar AV-100 (Telstar)
- Microscopio invertido Leica DMIL (Leica).
- Microscopio óptico Leica DM 1000 (Leica)
- Pipetas automáticas Eppendorf Research plus: P100-1000, P10-200, P2-20, P0.5-10.
- Centrífuga UV3 H1-15PK refrigerada (Sigma).
- Sistema automatizado Maxwell®16 Instrument, para extracción de ADN (Promega).
- Espectrofotómetro DS-11 DeNovix® (Delaware BioScience).
- Espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Fisher Scientific, Madrid, España).
- Termociclador Artik ThermalCycler® TCA0096 (Thermo Scientific).
- Fuente de alimentación de electroforesis Power Pak Basic (Biorad).
- Cubeta de electroforesis sumergida horizontal BioRad®.
- Transiluminador para captura de imágenes: Chemi-Doc (Biorad).
- Secuenciador automático MegaBACE 1000 (Healthcare Biosciences, Spain).

1.4. Otros materiales

- Puntas con y sin filtro para pipetas automáticas Eppendorf® Research plus P100-1000, P10-200, P2-20, P0.5-10.
- Papel Parafilm® (Bemis)

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

- Láminas portaobjetos 76x26x1 mm (Marienfeld)
- Láminas cubreobjetos 22x22 mm (Marienfeld).
- Tubos de polipropileno Eppendorf® 1.5 ml (Sigma Aldrich)
- Tubos de PCR con tapa 0.2 ml (VWR).
- Pipetas Pasteur de vidrio 7,1x 0,53 x 1,50 mm punta (VWR).
- Espátulas de laboratorio.
- Filtros de Nitrocelulosa, diámetro de poro 0.45 µm (Pall, Madrid-España).

1.5. Software.

- Image Lab, para el transiluminador Chemi-Doc (Biorad)
- ChromasPro, para la visualización de las secuencias.
- BLAST 2.2.31, para análisis de homología de las secuencias.
- MEGA 5.0, para el alineamiento y análisis filogenético de las secuencias.

2. Aislamiento y cultivo de AVL a partir de muestras ambientales.

2.1. Elección de las zonas de muestreo.

Sobre la base del conocimiento del potencial patógeno de algunas de las AVL para el humano, así como su función de transporte para otros microorganismos patógenos, su presencia en el ambiente donde el humano desempeña diversas actividades supone riesgos para el desarrollo de infecciones por estos protozoos y/o sus simbioses.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

Por ser una zona altamente turística, además de ser tierra de asentamientos de población indígena con actividades y costumbres particulares que incluyen contacto permanente con suelos y fuentes naturales de agua, se escogió el Municipio Cedeño del estado Bolívar, en el cual la Universidad Central de Venezuela, viene trabajando hace algunos años, como aliado de un proyecto de acción social (Proyecto Maniapure), para el mejoramiento de la calidad de vida de los pobladores de las comunidades indígenas y criollas de la región de Maniapure.

El estado Bolívar es una de las 24 entidades federales de Venezuela, ubicado en la Región Guayana, al sureste de Venezuela. Su capital es Ciudad Bolívar. Tiene una extensión geográfica de 238800 km² (25,96% del Territorio Nacional), convirtiéndolo en el mayor estado del país. Sus coordenadas son: 08° 25' Latitud N., 03° 48' Latitud N., 60° 50' Longitud O., y 67° 28' Longitud O. Su territorio está ocupado casi en su totalidad por el macizo guayanés. Posee una población estimada para el año 2015, de 1.824.190 habitantes, según el Instituto Nacional de Estadística (Instituto Nacional de Estadística, 2012), lo que lo convierte en el 7.^{mo} estado más poblado de Venezuela. Tiene una vegetación selvática y tiene clima de sabana y en su mayoría, está delimitado por el río Orinoco. Limita con varios estados de Venezuela y con las Repúblicas de Guyana y Brasil (Instituto Nacional de Estadística-República Bolivariana de Venezuela, 2011-b).

El estado Bolívar está especialmente dotado de variados ecosistemas de un altísimo potencial turístico, con majestuosos parques nacionales (parque Nacional Canaima), monumentos naturales, selva, grandes extensiones de sabana (La Gran Sabana), sitios históricos, comunidades indígenas, playas, ríos, saltos de agua como el Salto del Ángel (la caída de agua más alta del mundo), enormes reservas de recursos minerales (aluminio, diamante, hierro, manganeso, bauxita,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. <i>Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/</i>		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

oro y torio) y forestales, además del complejo hidroeléctrico del Río Caroní (Guri), así como gran variedad de fauna y flora (Instituto Nacional de Estadística, República Bolivariana de Venezuela, 2011-b).

Este estado es hogar de varios grupos étnicos originarios del país. Entre los grupos principales se encuentran los pemones, los yekuana, los sanemá, los panares o E'ñepá, los hotis y los piaroas. Todos estos grupos hablan sus propios idiomas, aunque la mayoría también habla el castellano.

Dentro del estado Bolívar, el Municipio Cedeño ocupa 46.020 km² y hasta 2011, se censaron 67.000 habitantes (Figura 23). Es asiento de las minas de bauxita en el sector Los Pijiguaos y de las minas de diamante y oro en la zona del Guaniamo; además de ser una importante zona agrícola, pecuaria y pesquera, posee tierras de extensas sabanas, colinas, cerros y rocas de crestas redondeadas que pueden alcanzar hasta los 300 metros sobre el nivel del mar. El municipio tiene una temperatura anual de 23 °C y es el hogar de importantes comunidades de etnias originarias. Los principales grupos autóctonos son los panares, los joti y los piaroas (Instituto Nacional de Estadística, República Bolivariana de Venezuela, 2011-b)



Figura 23. Ubicación del municipio Cedeño, en el estado Bolívar-Venezuela

Tomado de: [https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_Cedeño_\(Bolívar\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_Cedeño_(Bolívar))

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

En este municipio, se encuentra la región de Maniapure, la cual es la zona de influencia de la atención médico-social del Centro "La Milagrosa" y es la región escogida para el estudio de la presencia de AVL en las muestras de suelo. Esta región cubre una superficie cercana a los 1.500 km². Los pobladores de la región se encuentran distribuidos en 40 caseríos o comunidades dispersas, de las cuales 33 son criollas y 7 indígenas de la etnia Panare o E'ñepá (Figura 24 -A). Las comunidades se denominan: Chaviripa, Macanilla, Guamal, Corozal y Colorado. Los E'ñepás (Figura 24-B) se dedican a la producción de alimentos (agricultura de conucos) y a la recolección de productos silvestres, pero las actividades que les generan más ingresos económicos mediante la venta de los productos, que son la caza y la pesca. Estos indígenas son agricultores de tala y quema, pescan, cazan y recolectan frutos silvestres, y mantienen relaciones comerciales muy estrechas con los criollos, desde comienzos de siglo (Henley, 1982; Huber y Zent, 1995; González-Fernández, 2012).



Figura 24. A. Región de Maniapure, en el municipio Cedeño, Estado Bolívar.
B. Indígenas de la etnia Panare o E'ñepá

Adaptado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Etnia_E'ñepá_o_Panare; <https://www.ecured.cu/Eñepas>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

Por estar esta etnia expuesta constantemente a suelos donde pueden coexistir diversos géneros de AVL potencialmente patógenos, debido a las actividades y ocupaciones que realizan en su rutina diaria, al igual que cualquier visitante/turista de la zona, la identificación de estas AVL permitirá conocer mejor las condiciones epidemiológicas de las infecciones ocasionadas por las AVL patógenas, además de aportar información sobre otros géneros presentes en esta zona de Venezuela. Cabe destacar que es la primera vez que se realiza un estudio transversal sobre la presencia de AVL en muestras de suelo en Venezuela, sin estar asociado este estudio a ningún caso clínico informado previamente.

2.2. Toma de muestras

Las muestras de tierra fueron obtenidas en todas las comunidades incluidas en el estudio, a través de un escarificado poco profundo de la superficie de la tierra, siendo recolectadas dos muestras en las mismas coordenadas en viales estériles (Eppendorf® 2 mL) separados, para su posterior procesamiento. La temporada en la cual se recolectó la totalidad de las muestras (n=27) fue durante el verano o sequía, por lo que la mayoría de los caños estaban secos o medianamente húmedos. Los suelos escogidos para el muestreo en las comunidades (Ambulatorio La Milagrosa, Corosal, Guamal, Chaviripa y Macanilla) fueron de tipo arcilloso. Igualmente, las zonas seleccionadas para la recolección de las muestras, son áreas destinadas a la reunión comunitaria o de paso común. Las tierras fueron transportadas al Laboratorio de Amebas de Vida Libre en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de las Islas Canarias de la Universidad de La Laguna (IUETSPC, Tenerife, Islas Canarias-España) para su evaluación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

2.3. Siembra de muestras en placas de ANN

Una cantidad aproximada de 5 gr. de cada muestra de suelo fueron sembrados en placas de ANN al 2%, sin adición de *Escherichia coli* inactivada por calor, formando una estria longitudinal en el centro de la placa, con ayuda de una espátula, en ambiente de esterilidad. Las placas se sellaron con papel PARAFILM®M (Sigma-Aldrich) y se incubaron entre 25°C y 30°C.

2.4. Aislamiento de AVL

Las placas de ANN fueron observadas diariamente con un microscopio óptico invertido Leica DMIL, para evidenciar la presencia de trofozoítos o quistes de AVL. Para lograr el aislamiento de las AVL mediante clonaje, se recortó la zona de agar donde se encontraban las amebas y se sembró en una nueva placa de ANN, con el fin de separar las amebas de otros organismos (hongos, bacterias) presentes en las muestras. Este proceso se repitió hasta lograr el aislamiento puro de las amebas, obteniéndose una placa con un solo tipo de AVL, sin bacterias ni hongos, lo cual permite posteriormente, su axenización o su mantenimiento en cultivo monoxénico, para otros fines.

2.5. Extracción de ADN genómico

Para la identificación molecular de los aislados obtenidos, se usó el estuche o kit de purificación y extracción de ADN Maxwell® 16 según el manual N° TM284 (Promega). La superficie de los cultivos en ANN de los aislados de interés, se lavó y raspó con solución PAS estéril mantenida a 4°C (4 mL aproximadamente), para facilitar que los trofozoítos se despegaran del agar; se recogió todo el líquido y se colocó en tubos eppendorf® de 1,5 mL, se centrifugaron

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

los tubos a baja revolución (200g) por 10 minutos, luego se eliminó la mayoría del sobrenadante hasta dejar 0.5 mL y se resuspendió el sedimento, el cual se transfirió directamente a los cartuchos del kit, uno para cada muestra, y se programó el dispositivo de extracción.

Este procedimiento de extracción de ADN también se realizó en algunos casos, a partir de partes de agar donde se encontraba una gran concentración de amebas, ya que el equipo puede programarse para muestras sólidas y semi-sólidas como tejidos y agar y colocarse directamente en los cartuchos. El ADN quedó recogido en las columnas de elución y posteriormente se cuantificó usando el espectrofotómetro DS-11 DeNovix®. Las muestras se almacenaron a -20°C, hasta su utilización.

2.6. Identificación mediante PCR

Con el objetivo de clasificar a nivel molecular las AVL encontradas en las diferentes muestras, se realizó la PCR. Estas reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador Artik ThermalCycler (Thermo Scientific): para un volumen final de 50 µl se utilizaron 5 pmol de cada cebador, entre 40 y 100 ng de ADN de las amebas y 0,25 unidades de la enzima Taq polimerasa. Se usaron los cebadores universales para AVL, específicos de género para *Acanthamoeba* spp. y de las especies *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*; con su respectivos programas:

*- **Cebadores Universales gen 18S ADNr de Amebas de Vida Libre** (Tsvetkova *et al.*, 2004):

FLA-F: 5'- CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC - 3'

FLA-R: 5'- CAGGTAAAGGTCTCGTTCGTTAAC - 3'

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

Programa: 2 minutos a 95°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.

Producto obtenido: aprox. 505–513 pb

*- **Cebadores para *Acanthamoeba* spp.** (Schroeder *et al.*, 2001)

JDP1: 5'- GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA - 3'

JDP2: 5'- TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA - 3'

Programa: 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.

Producto obtenido: aprox. 423-551 pb.

*- **Cebadores para *Naegleria fowleri*** (De Jonckheere, 1998: De Jonckheere y Brown, 2005):

NFITSFW: 5'- TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA - 3'

NFITSRV: 5'- AATAAAAAGATTGACCATTGAAA - 5'

Programa: 2 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto 30 segundos a 55°C y 2 minutos a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.

Producto obtenido: aprox. 300-400 pb

*- **Cebadores para *Balamuthia mandrillaris*** (Booton *et al.*, 2003)

BAL1: 5'- CGCATGTATGAAGAAGACCA - 3'

BAL2: 5'- TTACCTATATAATTGTCGATACCA - 3'

Programa: 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C; y un ciclo final de 7 minutos a 72°C.

Producto obtenido: aprox. 1100-1200 pb.

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa sumergidos en tampón TAE 1X, empleando cubetas submarinas de desarrollo horizontal, bajo una diferencia de potencial de 5V/cm. Los porcentajes de agarosa oscilaron entre el 0.8 y el 2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a separar. El patrón de peso molecular empleado fue el de 100 pb, indicando los fragmentos desde 150 hasta 1500 pb (PCR BIO Ladder IV). Como controles se utilizaron cepas tipo del ATCC.

Las muestras se prepararon añadiendo 1 µl de tampón de carga para ADN por cada 2 µl de muestra de ADN. Para la visualización del ADN, se añadió al gel 0.12µl de RealSafe (Biotein) por cada ml de gel y se observó a través de un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 260 nm. Las imágenes fueron procesadas mediante el Chemi-Doc con el software ImageLab.

2.7. Genotipado de los aislados

La determinación del genotipo de los cultivos de AVL se basa en el análisis de la secuencia del fragmento del ARNr 18S, descrito previamente (Booton *et al.*, 2002). Las condiciones de la PCR para la secuenciación de ADN de las diferentes AVL aisladas siguieron el mismo patrón que aquellos utilizados para su amplificación. La secuenciación fue realizada en el Servicio de Secuenciación del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna y las secuencias obtenidas, fueron comparadas con aquellas disponibles en el GenBank, con la finalidad de establecer el género y especie de los nuevos aislados.

Las secuencias obtenidas se visualizaron mediante el programa ChromasPro, se analizó su homología con el programa BLAST 2.2.31 y para el alineamiento y análisis filogenético de las secuencias, se empleó el MEGA 5.0.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

2.8. Caracterización del potencial patogénico de las cepas axénicas: Osmotolerancia y Termotolerancia.

Para los ensayos de termotolerancia, se utilizaron amebas a partir de cultivos puros en ANN de los aislados. Estos cultivos fueron mantenidos e incubados a 28°C, 37°C y 44°C durante 72 horas.

La resistencia a dichas condiciones ensayadas permitió caracterizar los aislados de *Acanthamoeba* evaluados, como termotolerantes o no (Khan *et al.*, 2001, 2002), siendo potencialmente patógenos aquellos capaces de sobrevivir a temperaturas de 37°C y superiores.

Para examinar el efecto de la osmolaridad en el crecimiento de trofozoítos de AVL se incubaron un aproximado de 103 células en placas de agar no nutritivo que contenían 0,1 M y 1 M de manitol. Estas placas fueron incubadas a 28°C durante 72 horas. La resistencia al 1M de manitol, permitió caracterizar los aislados como osmotolerantes (Khan *et al.*, 2001).

3. Aislamiento y cultivo de AVL a partir de muestras clínicas.

3.1. Selección de las muestras.

El Laboratorio de Amibiasis-U.C.V, desde 1984 hasta 2014, evaluó 550 muestras clínicas, por ser laboratorio de referencia nacional para el diagnóstico y estudio de AVL en Venezuela. Para el género *Acanthamoeba*, las muestras fueron colectadas de diferentes pacientes e incluyeron diversas fuentes tales como hisopados de ojo, raspados corneales, heces, biopsias de diferentes tejidos, lentes de contacto, estuches de conservación de las lentillas, entre otros. De todas las muestras sospechosas de ser positivas para el género *Acanthamoeba*, se lograron aislar 18 cepas identificadas como *Acanthamoeba* spp, sobre la base de la morfología de trofozoítos/quistes en

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

placas de ANN (Page, 1988). Las cepas fueron nombradas como "A" para *Acanthamoeba*, además de un número secuencial según su aislamiento en el período de tiempo mencionado antes (ej. A1, A2...) y se mantienen en el Laboratorio, mediante pases sucesivos en medio ANN 2% más *E. coli* inactivada por calor. Estos aislados fueron traídos al Laboratorio de AVL del IUETSPC-ULL, para su clasificación a nivel de genotipo y estudiar su potencial patógeno. Los aislados se sembraron y mantuvieron en placas de ANN suplementadas con *Escherichia coli* inactivadas por calor, a temperatura ambiente (25-30°C).

3.2. Procesamiento de las muestras.

Una vez obtenido el crecimiento óptimo de los aislados, se procedió a realizar el mismo protocolo descrito para los aislados provenientes de los suelos: obtención de ADN genómico, identificación mediante PCR para el género *Acanthamoeba* spp. (Schroeder *et al.*, 2001) y posterior secuenciación para el genotipado de cada aislado. La secuenciación fue realizada en el Servicio de Secuenciación del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna y las secuencias obtenidas se visualizaron mediante el programa ChromasPro, se analizó su homología con el programa BLAST 2.2.31 y para el alineamiento y análisis filogenético de las secuencias, se empleó el MEGA 5.0.

Además, se evaluó el potencial patógeno de cada uno mediante el estudio de la termo y la osmotolerancia. Los datos obtenidos de la genotipificación fueron incorporados a la base de datos GenBank.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

4. Evaluación de LCR y muestras de agua para la identificación de *N. fowleri* en un caso fatal de MAP.

4.1 Obtención de las muestras

En relación con *Naegleria fowleri*, en el Laboratorio de Amibiasis, se han atendido tres casos *post-mortem*, de los cuales en dos de ellos se ha logrado el aislamiento del parásito a partir de muestras de LCR (datos sin publicar), pero por diversas razones, no se pudo estudiar el posible origen de la infección. En 2014, se presentó el tercer caso, igualmente *post-mortem*, el cual fue un paciente infantil, lactante, quien falleció por una MAP, en el estado Monagas, al Oriente de Venezuela; la madre del lactante solicitó la identificación del agente etiológico, la cual se realizó solo mediante PCR para *N. fowleri*, y no cultivo, por haber estado el LCR bajo refrigeración desde su toma hasta la llegada al Laboratorio de Amibiasis. Una alícuota de este LCR fue traído al Laboratorio de AVL del IUETSPC-ULL para confirmar la presencia de ADN de *N. fowleri*.

Posteriormente, la madre del paciente solicitó la evaluación de las fuentes de agua con las que el niño tuvo contacto, las cuales incluyeron: 9 muestras de una gran piscina recreativa grande (1G a 9G); 4 muestras de una piscina para niños (1P a 4P); 1 muestra del tanque de almacenamiento de agua de la casa del niño (1C); 3 muestras del surtidor principal de agua de la zona donde habitaba el niño (1PS a 3PS) y 1 muestra de una botella de agua potable utilizada por la madre del niño para bañarlo (1B). Las muestras fueron recogidas por triplicado en botellas de vidrio estériles y mantenidas a 4°C durante su transporte hasta su procesamiento en el laboratorio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

4.2 Procesamiento de las muestras.

Todas las muestras de agua fueron filtradas a través de membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45 µm, mediante un sistema colector de vacío. Cada filtro fue cortado en tres piezas y coloca en 2 placas de ANN 2 % complementadas con *Escherichia coli* inactivada por calor. Las placas se incubaron a 26, 37 y 42°C por 7 días y monitoreadas diariamente. Aquellas amebas que presentaron morfología compatible con el género *Naegleria*, que crecieron a temperaturas de 37 y 40°C en 7 días y resultaron positivas para la prueba de flagelación, se les extrajo ADN genómico y se verificaron mediante PCR específico para *Naegleria fowleri* (De Jonckheere, 1998; De Jonckheere y Brown, 2005), descrita anteriormente. Para la prueba de flagelación, se tomaron los trofozoítos de los cultivos con morfología compatible con *Naegleria* spp. y crecimiento a 37 y 42°C, y se colocaron en agua destilada a temperatura de 37°C, en agitación, con la finalidad de obtener en 24 horas formas flageladas (Cables y Johns, 1986).

La extracción de ADN, tanto del LCR como de los aislados sospechosos obtenidos del cultivo de las muestras de aguas, se realizó empleando el sistema de purificación de ADN Maxwell® 16 Manual #TM284 (Promega, Madrid, España) y su pureza determinada mediante espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Fisher Scientific, Madrid, España). Con la PCR empleando los cebadores propuestos por De Jonckheere, 1998 y De Jonckheere y Brown, 2005, se amplificó la región completa ITS (ITS1, 5.8S y ITS2) utilizando el par de cebadores NFITSFW y NFITSRV específicos para *N. fowleri*, para obtener un fragmento de alrededor de 300-400 pares de bases, dependiendo de la especie de *Naegleria*, según las condiciones para esta PCR descritas con anterioridad para los aislados de suelo y con ADN de una cepa tipo de *Naegleria fowleri*: ATCC 30894, como control positivo de la prueba.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Material y métodos

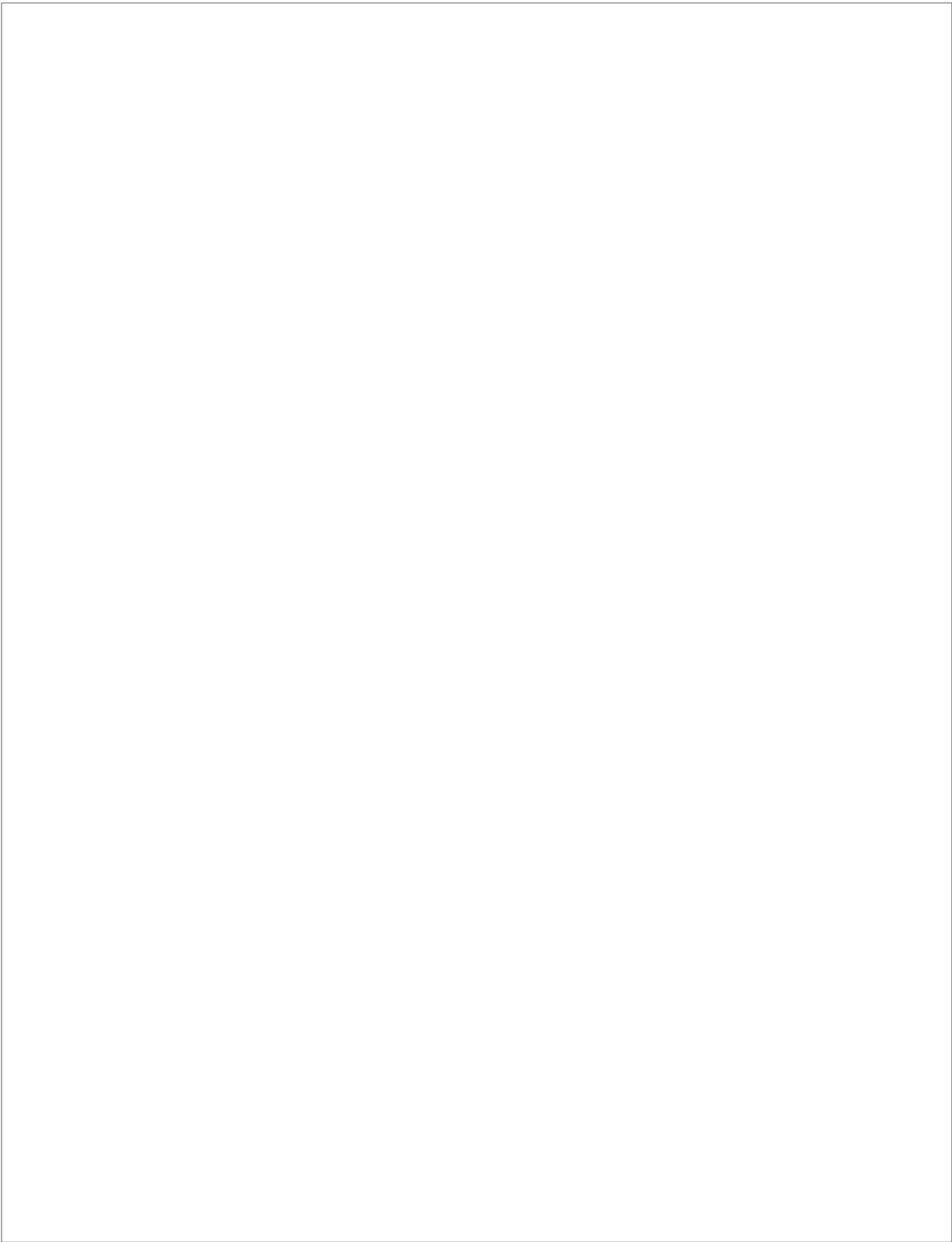
Luego de la purificación de los productos PCR obtenidos mediante el estuche de Qiaquick PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y su secuenciación utilizando un secuenciador automático MEGABACE 1000 (Healthcare Biosciences, Barcelona, España) en el Servicio de Secuenciación SEGAI, de la Universidad de La Laguna; las secuencias obtenidas se visualizaron con el ChromasPro, luego fueron alineadas y analizadas con el programa MEGA 5.0 y se realizó el análisis de homología de las secuencias mediante el programa BLAST 2.2.31, para comparar la secuencia de los amplicones obtenidos del LCR y de las muestras de agua.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

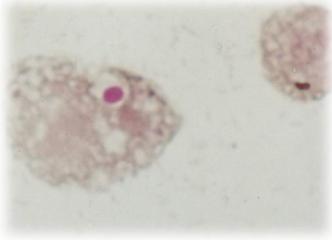


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ARTICULOS PUBLICADOS.

“El optimismo soluciona la mitad de cada problema”

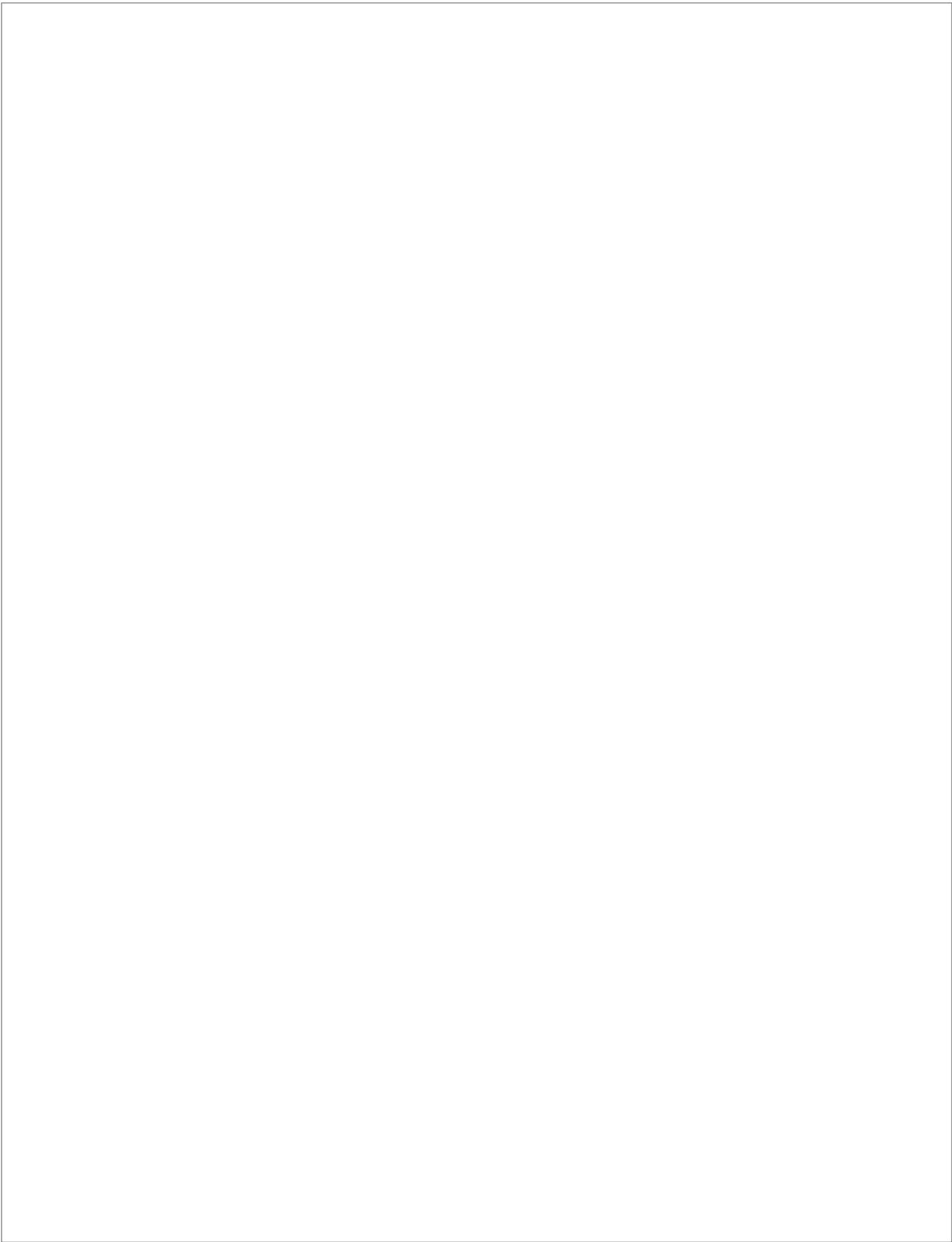
J.G Moore

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

ARTICULOS PUBLICADOS

1. **Wagner C**, Reyes-Batlle M, Hernán A, Rojas E, Pérez G, López-Arencibia A, Sifaoui I, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J.(2016). High occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 in soil sources from Bolívar State, Venezuela. *Acta Parasitologica*. 61(3):466-70.
2. **Wagner C**, Reyes-Batlle M, Ysea MA, Pérez MV, Guzmán de Rondón CG, Paduani AJ, Dorta Pérez A, López-Arencibia A, Sifaoui I, Pérez de Galindo MV, Pérez de Suárez EP, Martínez-Carretero E, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. (2016). Genotyping of clinical isolates of *Acanthamoeba* genus in Venezuela. *Acta Parasitologica*. 61(4):796-801.
3. **Wagner C**, Vethencourt Ysea MA., Galindo Pérez MV, Guzmán de Rondón C, Nessi Paduani AJ, Reyes-Batlle M., López-Arencibia A, Sifaoui I, Pérez de Galindo MV, Martínez-Carretero E, Valladares B, Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2017). Isolation of *Naegleria fowleri* from a domestic water tank associated with a fatal encephalitis in a 4 month-old Venezuelan child. *Tropical Biomedicine*, 34(2): 1–6.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

RESUMEN DE ARTICULOS.

Artículo 1: High occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 in soil sources from Bolívar State, Venezuela. *Acta Parasitologica*. 61(3):466-70.

Las cepas patógenas de *Acanthamoeba*, generalmente las del genotipo T4, son agentes causales de queratitis y encefalitis que, a menudo, puede ser fatal en los seres humanos y otros animales. En el presente estudio, veinte y siete (27) muestras de suelo se recolectaron en el Estado Bolívar en Venezuela para la búsqueda activa de la presencia del género *Acanthamoeba*. Las muestras fueron cultivadas en placas de ANN 2% con un suplemento de *E. coli* inactivada por calor. La amplificación por PCR y secuenciación de la región DF3 del ADNr 18S de *Acanthamoeba* se llevó a cabo para confirmar la identificación morfológica de las amebas, luego de su clonación. Además, se aisló *Acanthamoeba* spp del 51,8% de las muestras de suelo. La secuenciación de la región DF3 del ADNr 18S logró la identificación del genotipo T4 en todas las muestras. Hasta la fecha, este es el primer informe del genotipo T4 en muestras de suelo de Venezuela. Otros estudios deben realizarse en este Estado y resto del país, para determinar la prevalencia actual de *Acanthamoeba* en ambientes venezolanos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

High occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 in soil sources from Bolívar State, Venezuela

Carolina Wagner^{1,2}, María Reyes-Batlle¹, Aurora Hernán³, Elsy Rojas³, Gladymar Pérez³, Atteneri López-Arencibia¹, Ines Sifaoui^{1,4}, Enrique Martínez-Carretero¹, José E. Piñero¹, Basilio Valladares¹ and Jacob Lorenzo-Morales^{1*}

¹University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain; ²Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela; ³Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela; ⁴Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

Abstract

Pathogenic strains of *Acanthamoeba* are causative agents of keratitis and encephalitis that often may end fatal in humans and other animals. In the present study, twenty-seven soil samples were collected in the Bolívar State in Venezuela and checked for the presence of *Acanthamoeba*. Samples were cultivated onto 2% non-nutrient agar plates seeded with a layer of heat killed *E. coli*. Amplification by PCR and sequencing of the DF3 region of the 18S rDNA of *Acanthamoeba* was carried out in order to confirm morphological identification of the amoebae. Furthermore, *Acanthamoeba* spp. was isolated from 51.8% of soil samples. Sequencing of the DF3 region of the 18S rDNA resulted in the identification of genotype T4 in all samples. To the best of our knowledge, this is the first report of genotype T4 in soil sources from Venezuela. Further studies should be carried out in this State and in the country in order to determine the current occurrence of *Acanthamoeba* in Venezuelan environments.

Keywords

Acanthamoeba, genotype, soil, Bolívar State, Venezuela

Introduction

Free-living amoebae belonging to the genus *Acanthamoeba* and the species *Naegleria fowleri* and *Balamuthia mandrillaris* are causative agents of lethal encephalitis and multi-systemic infections as well as keratitis (in the case of *Acanthamoeba* genus) in humans and other animals (Culbertson *et al.* 1959; Siddiqui and Khan 2012; Lorenzo-Morales *et al.* 2013; Lasjerdi *et al.* 2015; Valladares *et al.* 2015).

Acanthamoeba strains are widely distributed in the environment worldwide and have been isolated from many habitats such as water, soil, dust and many others (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). To date, molecular classification of *Acanthamoeba* genus established 20 genotypes: T1-T20 that are based on the rRNA sequence of the isolates (Gast *et al.* 1996; Stothard *et al.* 1998; Horn *et al.* 1999; Gast 2001; Hewett *et al.* 2003; Booton *et al.* 2005; Nuprasert *et al.* 2010; Qvarnstrom *et al.* 2013; Magnet *et al.* 2014; Corsaro *et al.*

2015). Of the 20 genotypes, T4 is the most abundant in the environment and includes many pathogenic strains that have been associated with neurological and eye diseases (Stothard *et al.* 1998; Hewett *et al.* 2003). To date, there are no available studies in Venezuela focused on the identification of *Acanthamoeba* strains in soil sources. Therefore, the developed study aimed to check for the presence of *Acanthamoeba* in soil sources collected in the Bolívar State, Venezuela.

Materials and Methods

Sampling area and soil sample collection

The selected area for this study was the Bolívar State that is one of the 23 states of Venezuela. The state capital city is Ciudad Bolívar. Bolívar State covers a total surface area of

*Corresponding author: jmlorenz@ull.edu.es

- 10.1515/ap-2016-0063
Downloaded from De Gruyter Online at 09/19/2016 06:55:06PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

240,2500 km² and as of the 2011 census, presents a population of 1,410,964. The Bolívar State is characterized by high humidity and temperature conditions. Moreover, it includes savannah-like habitats and indigenous communities as well as National Parks and Landmarks such as the Angel Falls and the Canaima National Park. In our study, the Maniapure region in the Cedeño Municipality was chosen as the region of study since it is highly populated by indigenous communities of Venezuela and it is a highly conserved area with low pollution levels. This region is limited in the North and West by the Orinoco river and in the South-west by the Cerbatana mountains and it covers an area of 10.000 km².

Twenty-seven soil samples were collected in this region in points located around populated areas by the indigenous communities in the region (see Table I) by using 1 ml sterile centrifuge tubes. Approximately 1 g of each soil sample was inoculated onto 2% Non-Nutrient Agar (NNA) plates also seeded with heat killed *E. coli*, incubated at room temperature and checked daily for the presence of *Acanthamoeba* for up to a month.

DNA extraction and PCR amplification assay

DNA was extracted by placing 1–2 ml of amoebic cultures directly into the Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell® 16 Instrument as described in the Maxwell® 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain) as previously described (Todd *et al.* 2014). DNA amplification reactions were performed using genus specific markers for *Acanthamoeba*. A volume of 30µl containing approximately 40ng template DNA, Buffer (1X) without MgCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2.5pmol of each primer pair, and 1.25 units of Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, New Jersey), pH 8.3 was used for amplification in a Artik Cycler Thermocycler (Thermo Scientific). The cycling conditions were: initial denaturation of 95°C for five minutes; 40 repetitions of denaturation at 95°C for 45 seconds, annealing phase at 50°C

Table I. *Acanthamoeba* Isolates from soil samples collected at Municipio Cedeño in Bolívar state- Venezuela

Isolate ID	Location	Genotype	Genebank Accession #
B1	La Milagrosa N 06° 55' 665'', W 066°33' 690''	T4	KU065125
B4	Guamal N 07°03' 097'', W 066°30' 461''	T4	KU065124
B5	Guamal N 07°03' 108'', W 066°30' 403''	T4	KU065126
B9	Guamal N 07° 03' 138'', W 066° 30' 448''	T4	KU065127
B10	Guamal N 07° 03' 142'', W 066° 30' 444''	T4	KU065128
B11	Guamal N 07° 03' 138'', W 066° 30' 431''	T4	KU065129
B12	Chaviripa N 07° 07' 938'', W 066° 20' 761''	T4	KU065130
B13	Chaviripa N 07° 07' 945'', W 066° 30' 780''	T4	KU065131
B15	Chaviripa N 07° 07' 948'', W 066° 30' 840''	T4	KU065132
B17	Chaviripa N 07° 07' 948'', W 066° 30' 731''	T4	KU065133
B19	Chaviripa N 07° 08' 023'', W 066° 30' 767''	T4	KU065134
B22	Macanilla N 07° 11' 355'', W 066° 28' 273''	T4	KU065135
B26	Macanilla N 07° 11' 224'', W 066° 28' 287''	T4	KU065136
B27	Macanilla N 07° 11' 213'', W 066° 28' 312''	T4	KU065137

- 10.1515/ap-2016-0063

Downloaded from De Gruyter Online at 09/19/2016 06:55:06PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

for 45 seconds and elongation at 72°C for 45 seconds; and final elongation at 72°C for seven minutes. Amplification products were fractionated using 2% agarose electrophoresis stained with a solution of 20.000X of REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz, Madrid, Spain) and visualized under the UV light. *Acanthamoeba castellanii* Neff American Type Culture Collection (ATCC) 30010 strain was used as a positive control and distilled water added to the reaction mixture (instead of DNA) as the negative control.

Sequencing and genotyping of strains

PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany), according to the manufacturer's instructions, and sequenced in both directions. The sequencing was done in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Spain) using the University of La Laguna sequencing services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were edited and aligned using Mega 5.0 software program (Tamura *et al.* 2011). Phylogenetic analyses were carried out using the methodology described by Reyes-Battle *et al.* (2014), with Mega 5.0 software program. The sequences for the new isolates are deposited in the Genbank database and accession numbers are shown on Table I.

Results and Discussion

In this study, a 51.8% (14 of 27) of the collected soil samples were positive for *Acanthamoeba* spp. Moreover, phylogenetic analysis after sequencing of the DF3 region of the 18S rDNA gene indicated that all *Acanthamoeba* isolates obtained from these soil sources belonged to the T4 genotype (Fig. 1).

Acanthamoeba genotype T4 is the genotype most often associated with human infection (Booton *et al.*, 2005; Adamska *et al.* 2014; Lorenzo-Morales *et al.* 2015) but it is also the most commonly isolated genotype from the environment (Derda *et al.* 2014; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). However, a statistical analysis shows that the frequency of T4 association with human disease is not explained by its frequency in the environment alone (Maciver *et al.* 2013) and so in humans at least T4 is specifically pathogenic. Previous work from our group has shown that potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains are present in a variety of sources in the Canary Islands including soil sources (Lorenzo-Morales *et al.* 2005, 2006; Reyes-Battle *et al.* 2014). The obtained data specifically for soil sources in the Canary Islands have detected the presence of *Acanthamoeba* strains in 40% and 62.5% of the soil samples studied in the islands of Tenerife and Gran Canaria, respectively. Moreover, the most prevalent genotype was T4 (Reyes-Battle *et al.* 2014; Lorenzo-Morales *et al.* 2005).

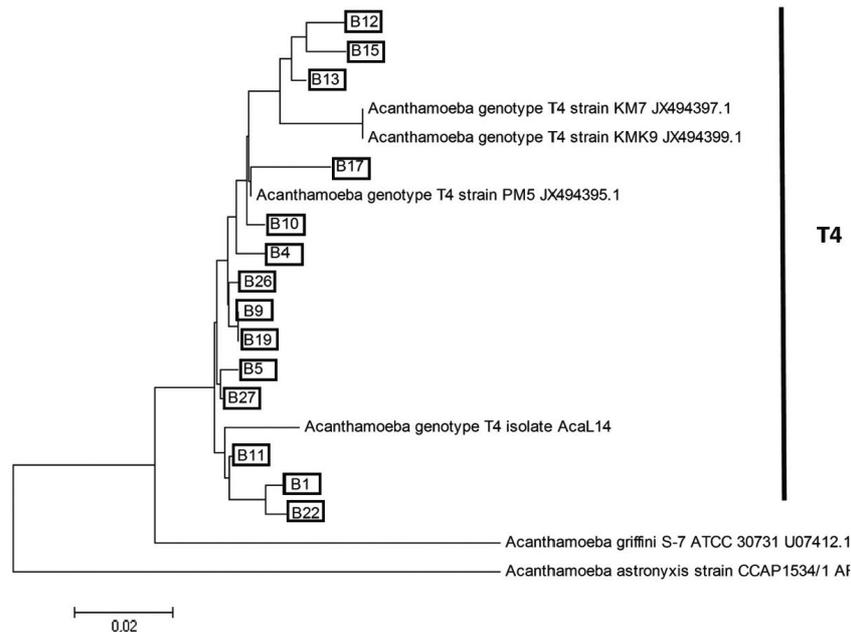


Fig. 1. 18S rDNA DF3 linearized neighbor-joining tree obtained by MEGA 5.0 for genotypes of *Acanthamoeba* isolates obtained from soils collected at *Municipio Cedeño*, Bolívar state-Venezuela. The type sequences were taken from GenBank and are presented under the following numbers: *Acanthamoeba. griffini* S-7 ATCC 3071 Accession #U07412.1; *Acanthamoeba* genotype T4 strain PM5 Accession #JX494395.1; *Acanthamoeba* genotype T4 strain KMK9 Accession #JX494399.1; *Acanthamoeba* genotype T4 isolate AcaL14 Accession # KJ094687.1; *Acanthamoeba* genotype T4 strain KM7 Accession #JX494397.1; *Acanthamoeba astronyxis* strain CCAP1534/1 Accession #AF239293.1

- 10.1515/ap-2016-0063

Downloaded from De Gruyter Online at 09/19/2016 06:55:06PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

In other regions, T4 have also been reported to be the most common genotype and occurrence of *Acanthamoeba* strains have varied from 26.6% in a dry region of Iran (Rahdar *et al.* 2012) to 63.9% in Jamaica (Todd *et al.* 2014). Furthermore, Geisen *et al.* (2014) supported the data mentioned above and obtained in this study, since they stated that genotype T4 was highly abundant in soil samples collected from many countries and regions worldwide (Geisen *et al.* 2014). Therefore, the high occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 found in the samples collected in this study is not surprising. Nevertheless, further studies should be developed in order to establish the pathogenic potential of the isolated strains and also awareness should be raised among clinicians and public health workers in this region, especially since the samples were collected from areas related to indigenous communities and their activities in this state of Venezuela.

Acknowledgments. This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain, the Project P113/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III, and Project ref. AGUA3 "Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua" from Caja-Canarias Fundación. CWA was supported by a grant from Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico -Universidad Central de Venezuela (Becario Exterior 2014-2015). ALA and MRB were funded by Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación Cajacanarias para Postgraduados 2014". IS was funded by Ayudas para estancias investigadores- ULL, 2015. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RYC-2011-08863.

References

- Adamska M., Leonska-Duniec A., Lanocha N., Skotarczak B. 2014. Thermophilic pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. *Acta Parasitologica*, 59, 433–441
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1689–1693
- Corsaro D., Walochnik J., Köhler M., Rott M.B. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*, 114, 2481–2490
- Culbertson C.G., Smith J.W., Cohen H.K., Minner J.R. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *American Journal of Pathology*, 3, 185–197
- Derda M., Wojtkowiak-Giera A., Hadaś E. 2014. Comparative analyses of different genetic markers for the detection of *Acanthamoeba* spp. Isolates. *Acta Parasitologica*, 59, 472–427
- Gast R.J., Ledee D.R., Fuerst P.A., Byers T.J. 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43, 498–504
- Gast R.J. 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 609–615
- Geisen S., Fiore-Donno A.M., Walochnik J., Bonkowski M. 2014. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitology Research*, 113, 3151–3158
- Hewet M.K., Robinson B.S., Monis P.T., 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
- Horn M., Fritsche T.R., Gautom R.K., Schleifer K.H., Wagner M. 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology*, 1, 357–367
- Lasjerdi Z., Niyyati M., Lorenzo-Morales J., Haghghi A., Taghipour N. 2015. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran. *Acta Parasitologica*, 60, 417–422
- Lorenzo-Morales J., Monteverde-Miranda C.A., Jiménez C., Tejedor M.L., Valladares B., Ortega-Rivas A. 2005. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 233–236
- Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Martínez E., Khoubbane M., Artigas P., Periago M.V., Foronda P., Abreu-Acosta N., Valladares B., Mas-Coma S. 2006. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Tropica*, 100, 63–69
- Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Arnalich-Montiel F., Piñero J.E., Valladares B. 2013. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?. *Trends in Parasitology*, 29, 181–187
- Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22, 10
- Maciver S.K., Asif M., Simmen M.W., Lorenzo-Morales J. 2013. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *European Journal of Protistology*, 49, 217–221
- Magnet A., Henriques-Gil N., Galván-Díaz A.L., Izquierdo F., Fenoy S., del Aguila C. 2014. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology Research*, 113, 2845–2850
- Nuprasert W., Putapornpit C., Pariyakanok L., Jongwutiwes S. 2010. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 4636–4640
- Qvarnstrom Y., Nerad T.A., Visvesvara G.S. 2013. Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60, 626–633
- Rahdar M., Niyyati M., Salehi M., Fegghi M., Makvandi M., Pourmehdi M., Farnia S. 2012. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in Ahvaz City, Khuzestan Province Southern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 7, 22–26
- Reyes-Battle M., Todd C.D., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Cabello-Vilchez A.M., González A.C., Córdoba-Lanús E., Lindo J.F., Valladares B., Piñero J.E., Lorenzo-Morales J. 2014. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, 113, 1383–1388
- Siddiqui R., Khan N.A., 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*, 5, 6
- 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.,

- 10.1515/ap-2016-0063

Downloaded from De Gruyter Online at 09/19/2016 06:55:06PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

- Byers T.J. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 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. *Molecular Biology and Evolution*. 28, 2731–2739
- Todd C.D., Reyes-Battle M., Martín-Navarro C.M., Dorta-Gorrín A., López-Arencibia A., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Valladares B., Lindo J.F., Lorenzo-Morales J. 2015. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from soil sources from Jamaica, West Indies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 416–421
- Valladares M., Reyes-Battle M., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Dorta-Gorrín A., Wagner C., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Valladares B., Lorenzo-Morales J. 2015. Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Archives of Microbiology*, 197, 639–643

Received: November 18, 2015

Revised: January 28, 2016

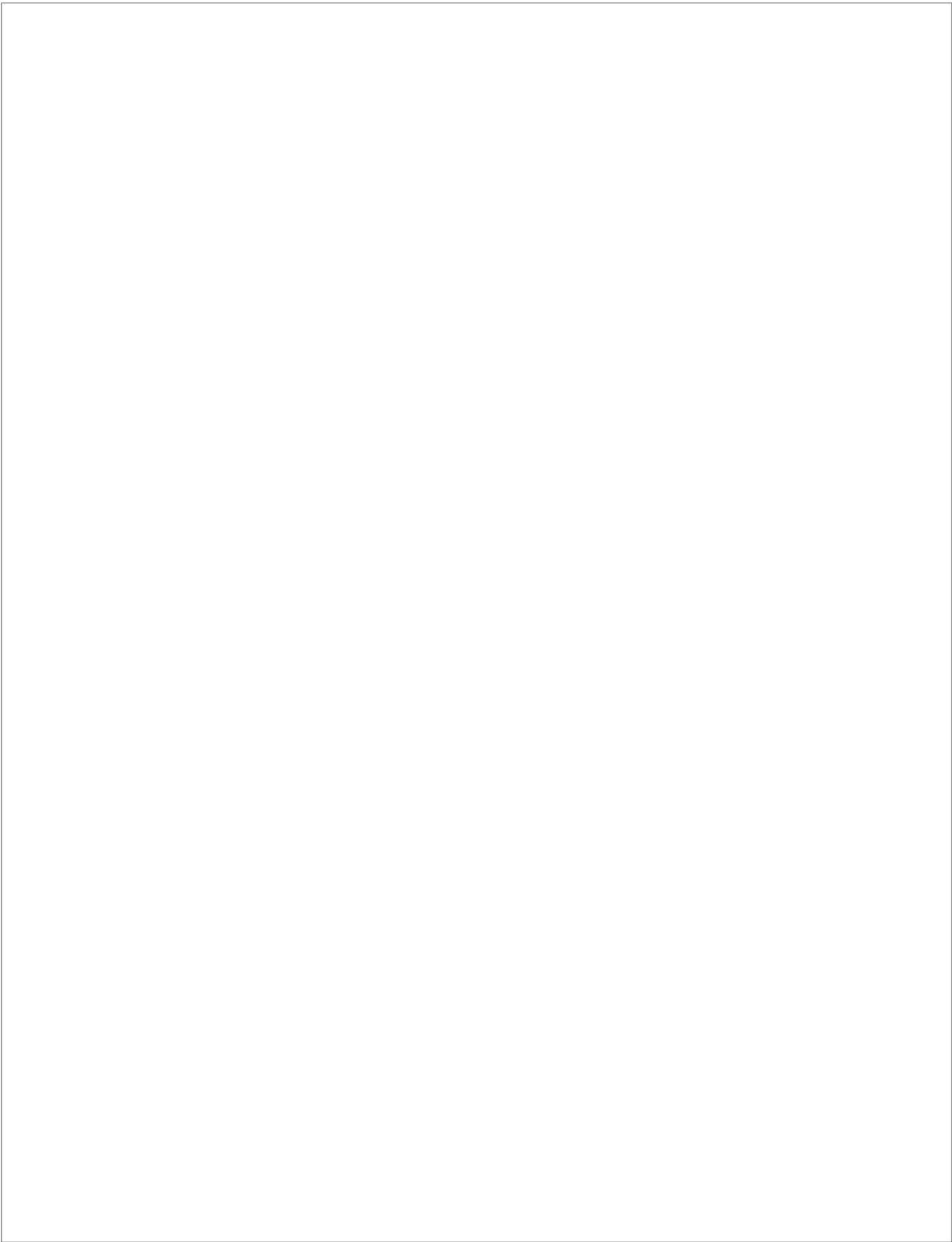
Accepted for publication: February 3, 2016

- 10.1515/ap-2016-0063

Downloaded from De Gruyter Online at 09/19/2016 06:55:06PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

Artículos publicados

Artículo 2:

Genotyping of clinical isolates of *Acanthamoeba* genus in Venezuela. *Acta Parasitologica*. 2016, 61(4):796-801.

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* son patógenos oportunistas distribuidos en todo el mundo. Las cepas incluidas en este género son agentes causales de queratitis y encefalitis fatal en seres humanos y otros animales. En este estudio, 550 muestras clínicas recolectadas entre 1984 y 2014, de diversos pacientes con sospecha de infecciones por *Acanthamoeba*, fueron evaluadas inicialmente para la identificación de este género, en el Laboratorio de Amibiasis-Escuela de Bioanálisis en la Universidad Central de Venezuela. Las muestras fueron cultivadas en placas de ANN 2% con un suplemento de *Escherichia coli* inactivada por calor. De las 550 muestras clínicas incluidas en este estudio, 18 de ellos resultaron positivas para el género *Acanthamoeba* después de la identificación morfológica en cultivo. Por otra parte, las muestras positivas fueron confirmadas después mediante la amplificación del fragmento diagnóstico (DF3) del ADNr 18S del género *Acanthamoeba* y posterior secuenciación, para el genotipado de las cepas aisladas de *Acanthamoeba*. Además, se comprobó el potencial patógeno de las cepas mediante la realización de ensayos termotolerancia y de osmotolerancia. La secuencia de la región DF3 permitió la identificación del genotipo T4 en todas las cepas aisladas. Aunado a esto, la mayoría de los aislados fueron termotolerantes y termotolerantes y/o osmotolerantes, por lo que se clasificaron como cepas potencialmente patógenas. Hasta la fecha, éste es el primer informe sobre la caracterización molecular a nivel de genotipo de las cepas de *Acanthamoeba* en Venezuela.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Genotyping of clinical isolates of *Acanthamoeba* genus in Venezuela

Carolina Wagner^{1,2}, María Reyes-Batlle¹, María Alejandra Vethencourt Ysea²,
Mónica V. Galindo Pérez², Carmen Guzmán de Rondón², Anaibeth J. Nessi Paduani²,
Angelyseb Dorta Pérez², Atteneri López-Arencibia¹, Ines Sifaoui^{1,3}, María Virginia Pérez de Galindo²,
Eva Pérez de Suárez², Enrique Martínez-Carretero¹, Basilio Valladares¹,
José E. Piñero¹ and Jacob Lorenzo-Morales¹

¹University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain; ²Laboratorio de Amibiasis-Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela; ³Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

Abstract

Free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus are opportunistic pathogens distributed worldwide. Strains included in this genus are causative agents of a fatal encephalitis and a sight-threatening keratitis in humans and other animals. In this study, 550 clinical samples which were collected between 1984 and 2014 from different patients with suspected infections due to *Acanthamoeba* were initially screened for the presence of this amoebic genus at the Laboratorio de Amibiasis-Escuela de Bioanálisis at the Universidad Central de Venezuela. Samples were cultured in 2% Non-Nutrient agar plates seeded with a layer of heat killed *Escherichia coli*. From the 550 clinical samples included in this study, 18 of them were positive for *Acanthamoeba* genus after culture identification. Moreover, positive samples were confirmed after amplification of the Diagnostic Fragment 3 (DF3) of the *Acanthamoeba* 18S rDNA genus and sequencing was carried out in order to genotype the isolated strains of *Acanthamoeba*. Furthermore, the pathogenic potential of the strains was checked by performing thermotolerance and osmotolerance assays. Sequencing of the DF3 region resulted in the identification of genotype T4 in all the isolated strains. Moreover, most isolates were thermotolerant or both thermotolerant and osmotolerant and thus were classified as potentially pathogenic strains. To the best of our knowledge, this is the first report on the molecular characterization at the genotype level of *Acanthamoeba* strains in Venezuela.

Keywords

Acanthamoeba spp., Venezuela, clinical samples, genotype

Introduction

Acanthamoeba sp. initially called *Amoeba polyphagus* was first isolated from a dust sample in 1913 by Puschkarew. It was later renamed *Acanthamoeba polyphaga* by Page in 1967 (Visvesvara *et al.* 2007). In 1930, Castellani found an amoeba contaminant in a culture of *Cryptococcus pararoseus* and called it *Hartmannella castellanii*, which was later reclassified as *Acanthamoeba castellanii* after the establishment of this new genus by Volkonsky in 1931 (Ma *et al.* 1990). All genera of Free Living Amoeba (FLA) were considered to be

non-pathogenic until Culbertson and colleagues, while trying to produce a poliomyelitis vaccine, noted that a species of *Acanthamoeba* could cause death in laboratory animals (Culbertson *et al.* 1959). Later in 1970, Singh and Das assigned it to the species *A. culbertsoni* (Ma *et al.* 1990; Visvesvara *et al.* 2007). Since then many species of *Acanthamoeba* have been found to be associated with severe neurological, cutaneous and corneal diseases (Schuster *et al.* 2002; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Visvesvara *et al.* 2007; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

To date, molecular classification of *Acanthamoeba* genus is widely accepted and 20 genotypes have been established

*Corresponding author: jmlorenz@ull.edu.es

Brought to you by | Imperial College London
Authenticated
Download Date | 11/11/16 9:54 AM

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

so far, T1-T20 based on the analysis of the rRNA sequence (Gast *et al.* 1996; Stothard *et al.* 1998; Horn *et al.* 1999; Gast, 2001; Hewett *et al.* 2003; Booton *et al.* 2005; Qvarnstrom *et al.* 2013; Magnet *et al.* 2014; Corsaro *et al.* 2015). Of the 20 genotypes, T4 is the most abundant in the environment and includes many pathogenic strains which have been associated with neurological and eye diseases (Stothard *et al.* 1998; Hewett *et al.* 2003; Khan, 2006; Geisen *et al.* 2014).

In Venezuela, the incidence of *Acanthamoeba* infections is unknown. So far, only a few cases have been reported and documented at the Laboratorio de Amibiasis-Escuela de Bioanálisis (LAEBIOUCV) at the Universidad Central de Venezuela. This laboratory has been in charge of investigating FLA infections in Venezuela since 1984 (García-Tamayo *et al.* 1980; Bermúdez *et al.* 1993; Bermúdez *et al.* 1998; Pérez de Galindo 2006; Pérez de Galindo *et al.* 2012; Dorta *et al.* 2012; Wagner *et al.* 2011). Regarding molecular identification of *Acanthamoeba* strains, no studies focused on the genotyping of this amoebic genus have been developed until now in Venezuela.

Therefore, this study was aimed to investigate the genotypes of *Acanthamoeba* presented in clinical isolates from Venezuela. To the best of our knowledge, this is the first time that a molecular characterization of *Acanthamoeba* strains at the genotype level is described in Venezuela.

Materials and Methods

Initial isolation of *Acanthamoeba* strains

550 clinical samples were evaluated for the presence of *Acanthamoeba* genus at LAEBIOUCV, from 1984 to 2014. Samples were collected from different patients and included many sources such as eye swabs, corneal scrapes, faeces, biopsies, contact lenses and their cases among others. From all the checked samples which were suspected to be positive for *Acanthamoeba* genus, 18 *Acanthamoeba* strains were obtained and identified as *Acanthamoeba* spp, on the basis of trophozoites/cysts morphology in agar plates (Page, 1988). Strains were named as "A" for *Acanthamoeba*, plus a sequential number according to their isolation in the period of time mentioned above (i.e. A1, A2...). These isolates were sent to the University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands at University of La Laguna (Tenerife, Canary Islands, Spain) in order to classified them at the genotype level. Amoebic strains were kept in 2% Non-Nutrient Agar (NNA) plates also seeded with heat killed *E. coli* and incubated at room temperature until needed for further assays.

DNA extraction and PCR amplification assay

DNA was extracted by placing 1–2 ml of amoebic cultures directly into the Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit

sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell® 16 Instrument as described in the Maxwell® 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain) as previously described (Cabello-Vílchez *et al.* 2014). DNA amplification reactions were performed using genus specific markers for *Acanthamoeba*. A volume of 30 µl containing approximately 40 ng template DNA, Buffer (1X) without MgCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2.5 pmol of each primer pair, and 1.25 units of Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, New Jersey), pH 8.3 was used for amplification in a Artik Cyler Thermocycler (Thermo Scientific). The cycling conditions were: initial denaturation of 95°C for five minutes; 40 repetitions of denaturation at 95°C for 45 seconds, annealing phase at 50°C for 45 seconds and elongation at 72°C for 45 seconds; and final elongation at 72°C for seven minutes. Amplification products were fractionated using 2% agarose electrophoresis stained with a solution of 20.000X of REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz, Madrid, Spain) and visualized under the UV light. *Acanthamoeba castellanii* Neff American Type Culture Collection (ATCC) 30010 strain was used as a positive control and distilled water added to the reaction mixture (instead of DNA) as the negative control.

Sequencing and genotyping of strains

PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany), according to the manufacturer's instructions, and sequenced in both directions. The sequencing was done in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Spain) using the University of La Laguna sequencing services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were edited and aligned using Mega 5.0 software program (Tamura *et al.* 2011). Phylogenetic analyses were carried out using the methodology described by Reyes-Battle *et al.* (2014), using the Mega 5.0 software program.

Tolerance assays

Thermotolerance and osmotolerance assays were performed as previously described (Todd *et al.* 2015). Briefly, for the osmotolerance assays 10³ trophozoites were inoculated onto 2% non-nutrient agar plates containing mannitol 0.5 M and 1.0 M, and seeded with heat killed *E. coli* to investigate osmotolerance. Plates were checked for amoebic growth with an inverted microscope for a period up to 72 h. To investigate thermotolerance, 10³ trophozoites were inoculated in the centre of different 2% NNA plates seeded with heat killed *E. coli*. The plates were incubated at 28°C, 37°C, 44°C, and monitored using an inverted microscope at 24, 48 and 72 h. The procedure was carried out using positive and negative controls as previously described (Todd *et al.* 2015).

Brought to you by | Imperial College London
Authenticated
Download Date | 11/11/16 9:54 AM

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Results and Discussion

In this study, 18 clinical strains of *Acanthamoeba* were isolated and classified at the genotype level after analysis of the DF3 region of the 18S rDNA gene of *Acanthamoeba*. Moreover, the pathogenic potential of the strains was established using thermotolerance and osmotolerance assays.

Regarding the genotyping studies, all the studied isolates were classified as members of the T4 genotype after homology and phylogenetic analyses (Table I and Fig. 1). The sequences for the new isolates are deposited in the Genebank database under the accession numbers KT934531-KT934547 and KT955003.

Moreover, the pathogenic potential of these isolates was investigated by observing their ability to grow on non-nutrient agar plates seeded with *E. coli* and exposed to different ranges of temperature and osmolarity. Those considered to be potentially pathogenic were amoebae that displayed excellent or relative growth at 37 °C (thermotolerant) and in 1 M mannitol (osmotolerant). The obtained results revealed that most of the isolates displayed good or excellent growth at 37 °C or higher temperatures, however only a few of them were able to grow at concentrations of 1 M mannitol or higher (Table 1). Even though, the strains were thermotolerant it seems that only a few showed osmotolerance. This observation is surprising since most clinical isolates obtained in previous studies have shown to be both thermo and osmotolerant (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Nevertheless, all the isolates did grow at concentrations of 0.5 M mannitol and were isolated from clinical samples which were collected from patients showing compatible symptoms of amoebic infection. Further studies should

be developed with the obtained strains in order to check whether osmotolerance assays are really a possible marker of pathogenic potential for clinical strains of *Acanthamoeba*. Other factors such as long term culture of some of the strains could be also related to the loss of the ability of these amoebae to grow in high osmotic pressure conditions as it has also been previously described by other authors (Koshler *et al.* 2008; Pumidonming *et al.* 2010; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

Since 1984, LAEBIOUCV has been working on the diagnosis of FLA infections in Venezuela at National level. During these years the isolated strains have been kept in order to gather information about FLA infections and involved strains/genera in the country. Recently and in order to complete the available data for these isolates, these samples have been assessed at the IUETSPC so the molecular identification of the *Acanthamoeba* strains is fully developed. Interestingly, human infections by *Acanthamoeba* as well as other FLA are not well documented in Venezuela even though clinical cases have been observed by LAEBIOUCV since 1984. Most of the available reports of FLA infections in this country have been provided by LAEBIOUCV, however the majority of the amoebic agents have been only classified at the genus level using morphological tools (Pérez de Galindo 2006; Pérez de Galindo *et al.* 2011; Wagner *et al.* 2011; Dorta *et al.* 2012; Wagner *et al.* 2012). Regarding molecular identification approaches, there are only two previous studies in Venezuela which were carried out using RFLP-PCR in order to identify some of the *Acanthamoeba* strains included in this study at the species level (Conde and Machado 2010; Luongo *et al.* 2012); Therefore, the classification of the strains at the genotype level was

Table I. *Acanthamoeba* clinical isolates from Venezuela. LAEBIOUCV/ IUETSPC- ULL. 1984-2014

Isolate ID	Source	Genotype	Thermotolerance 28/37/44C	Osmotolerance 0.5M / 1M mannitol	Genebank accession #
A2	Nasal swab	T4	+ /+ /-	+ /+	KT934531
A9	Conjunctival swab	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934532
A12	Corneal scrape	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934533
A13	Feces	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934534
A14	Feces	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934535
A15	Corneal scrape	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934536
A16	Corneal scrape	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934537
A18	Conjunctival swab	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934538
A21	Conjunctival swab	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934539
A23	Corneal scrape	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934547
A25	Corneal scrape	T4	+ /- /-	+ /+	KT934540
A26	Corneal scrape	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934541
A27	Corneal scrape	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934542
A28	Contact lenses	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934543
A29	Contact lenses	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934544
A30	Brain biopsy	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934545
A31	Corneal ulcer	T4	+ /+ /-	+ /-	KT955003
ASS	Saline Solution (NaCl 0.9%)	T4	+ /+ /-	+ /-	KT934546

Brought to you by | Imperial College London
Authenticated
Download Date | 11/1/16 9:54 AM

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

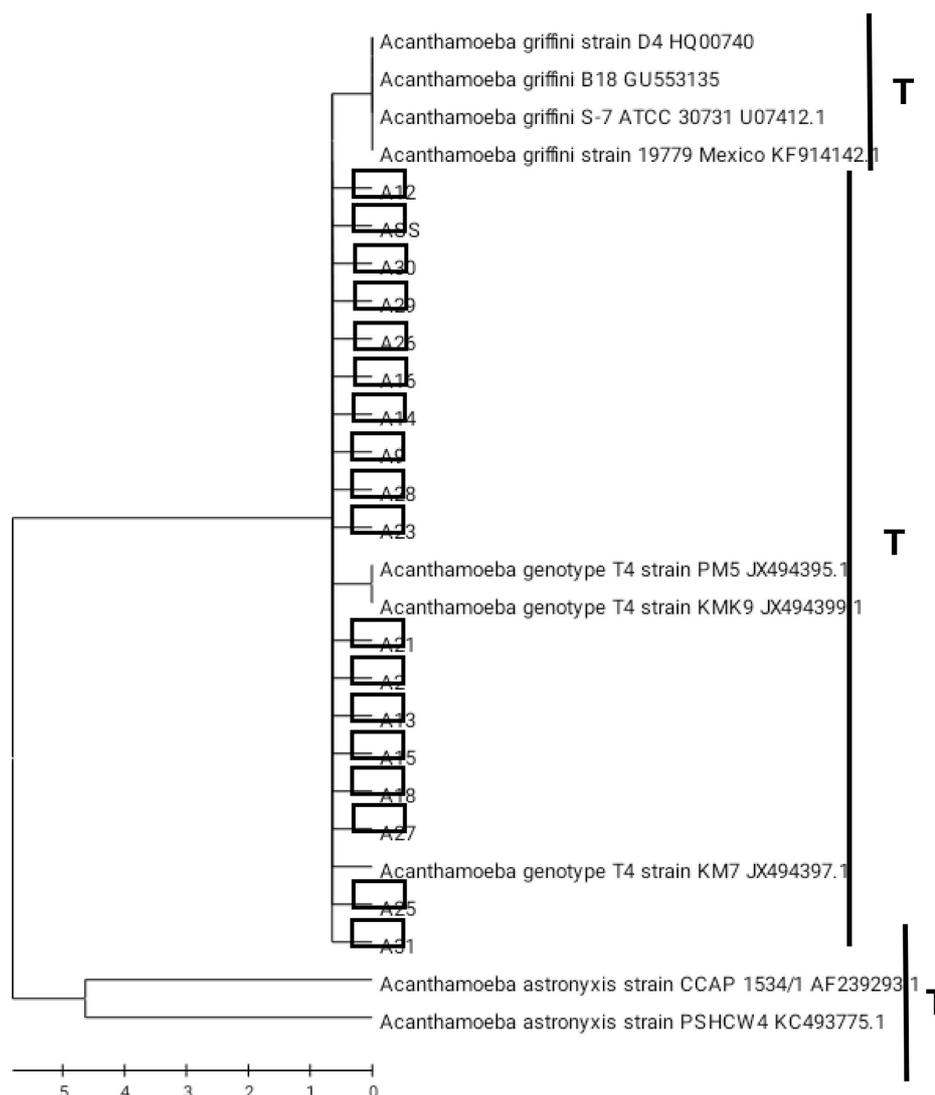


Fig. 1 18S rDNA DF3 linearized neighbor-joining tree obtained by MEGA 5.0 for genotypes of *Acanthamoeba* clinical isolates from Venezuela. The type sequences were taken from GenBank and are presented under the following numbers: *Acanthamoeba. griffini* strain D4 Accession #HQ0074; *Acanthamoeba. griffini* B18 Accession #GU553135; *Acanthamoeba. griffini* S-7 ATCC 3071 Accession #U07412.1; *Acanthamoeba. griffini* strain 19779 Mexico Accession #KF914142.1; *Acanthamoeba* genotype T4 strain PM5 Accession #JX494395.1; *Acanthamoeba* genotype T4 strain KMK9 Accession #JX494399.1; *Acanthamoeba* genotype T4 strain KM7 Accession #JX494397.1; *Acanthamoeba astronyxis* strain CCAP1534/1 Accession #AF239293.1, *Acanthamoeba astronyxis* strain PSHCW4 Accession #KC493775

aimed in this study in order to determine the genotypes presented in clinical cases of Venezuela.

To the best of our knowledge, this is the first report on the classification of *Acanthamoeba* strains at the genotype level in Venezuela. Furthermore, this study provides epidemiological data on the disease caused by amoebae of the genus *Acanthamoeba* in Latin America and worldwide. The identification

of all isolates as members of the T4 genotype should raise awareness among clinicians and health authorities in this country, since this genotype has been reported to be the most common in environmental and clinical sources worldwide.

Acknowledgements. This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas

Brought to you by | Imperial College London
Authenticated
Download Date | 11/1/16 9:54 AM

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain and the Project FIS PI13/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III and Project ref. AGUA3 "Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua" from CajaCanarias Fundación. CWA was supported by a grant from Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico -Universidad Central de Venezuela (Becario Exterior 2014-2015). MRB and ALA were funded by Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación CajaCanarias para Posgraduados de la Universidad de La Laguna. Convocatoria 2014. IS was supported by a grant from the Laboratoire Matériaux- Molécules et Applications, IPEST, and Ayudas para estancias estudiantas de posgrado e investigadores del continente americano y africano 2015 from the ULL. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competivity RYC-2011-08863.

References

- Bermúdez A., Díaz O., Pérez M.V., Pérez E. 1993. *Acanthamoeba* in the Ophthalmology Service of the University Hospital of Caracas (*Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas). *Anales del Instituto Barraquer (Barcelona)*, 24, 63–68
- Bermúdez A., Pérez de Galindo M.V., Martínez Y., Pérez de Suarez E., Nieto T. 1998. Identification of *Acanthamoeba* spp. in 3 patients with conjunctivitis (*Identificación de Acanthamoeba spp. en 3 pacientes con conjuntivitis*). *Anales del Instituto Barraquer (Barcelona)*, 27, 157–163
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1689–1693
- Cabello-Vilchez A.M., Reyes-Battle M., Montalbán-Sandoval E., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Elias-Letts R., Guerra H., Gotuzzo E., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Maciver S.K., Valladares B., Lorenzo-Morales J. 2014. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. *Parasitology Research*, 113, 2509–2513
- Conde C., Machado R. 2010. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular samples at the Bioanalysis School.-UCV using PCR-RFLP of the 18S ribosomal subunit (*Caracterización molecular por PCR-RFLP de la subunidad ribosomal 18S, de aislados de Acanthamoeba spp. mantenidos en el laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis-UCV provenientes de muestras oculares de pacientes. Trabajo presentado para optar por título de Licenciado en Bioanálisis.*) May 2010
- Corsaro D., Walochnik J., Köhler M., Rott M.B. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*, 114, 2481–2490
- Culbertson C.G., Smith J.W., Cohen H.K., Minner J.R. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *American Journal of Pathology*, 3, 185–197
- Chinchilla M., Castro Elfaró M., Portilla E. 1979. Free-living amoebae as causative agents of meningoencephalitis. First reports in Costa Rica (*Amebas de vida libre productoras de meningoencefalitis. Primeros hallazgos en Costa Rica*). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 21, 135–142
- Dorta A., Wagner C., Pérez de G. M.V., Blanco de M.J., Galindo M., Nessi A., Vethencourt M.A., Bandes A., Guzmán de Rondón C. 2012. Evaluation of the biological activity of the methanolic and hexanolic extracts of *Pera distichophylla* against an *Acanthamoeba* strain isolated from a corneal ulcer (*Evaluación de la actividad biológica de los extractos hexanólico (Eh) y metanólico (Em) de Pera distichophylla sobre un aislado de Acanthamoeba spp. proveniente de una úlcera corneal*). *Revista IberoLatinoamericana de Parasitología*, 271, 42–54
- García-Tamayo J., González J.E., Martínez A.J. 1980. Primary Amoebic Encephalitis and Granulomatous Amoebic Encephalitis. Comparative study of two Venezuelan cases. (*Meningoencefalitis amibiana primaria y encefalitis granulomatosa amibiana. Estudio comparativo de dos casos venezolanos*). *Acta Médica Venezolana*, 27, 84–91
- Gast R.J. 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 609–615
- Gast R.J., Ledee D.R., Fuerst P.A., Byers T.J. 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43, 498–504
- Geisen S., Fiore-Donno A.M., Walochnik J., Bonkowski M. 2014. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitology Research*, 113, 3151–3158
- Hewet M.K., Robinson B.S., Monis P.T., 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
- Horn M., Fritsche T.R., Gautom R.K., Schleifer K.H., Wagner M. 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology*, 1, 357–367
- Khan N.A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 564–595
- Khan N.A. 2009. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Caister Academic Press: Norfolk, Great Britain, pp. 290
- Kong H.H., Chung D.I. 2002. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and 18S Small-Subunit Ribosomal DNA PCR-RFLP Analyses of *Acanthamoeba* Isolated from Contact Lens Storage Cases of Residents in Southwestern Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1119–1206
- Köhler M., Leitsch D., Fünkrantz U., Duchêne M., Aspöck H., Walochnik J. 2008. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitology Research*, 102, 1069–1072
- Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22, 10
- Luongo V., Ugarte-Pelayo A., Galindo M., Vethencourt M.A. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. isolates (*Caracterización molecular de aislados de Acanthamoeba spp.*) *Acta científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas*, 13–15, 27–33
- Ma P., Visvesvara G.S., Martínez A.J., Theodore F.H., Daggett P.M., Sawyer T.K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Review Infectious Diseases*, 12, 490–513
- Magnet A., Henriques-Gil N., Galván-Díaz A.L., Izquierdo F., Fenoy S., del Aguila C. 2014. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology Research*, 113, 2845–2850
- Marciano-Cabral F., Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 273–307
- Page F.C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Cumbria, UK pp. 122
- Pérez de Galindo M.V., Galindo M., Dorta A., Guzmán de Rondón C., Wagner C., Vethencourt M.A., Nessi A., Bermúdez A.,

Brought to you by | Imperial College London
Authenticated
Download Date | 11/11/16 9:54 AM

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

- Pérez de Suárez E. 2012. Findings of Free-Living Amoebae of Acanthamoeba and Naegleria genus. A Venezuelan experience (*Hallazgos de Amibas de Vida Libre de los géneros Acanthamoeba y Naegleria. Una experiencia venezolana*). *VITAE Academia Biomédica Digital*, 51
- Pumidonming W., Koehsler M., Walochnik J. 2010. *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitology Research*, 106, 553–559
- Qvarnstrom Y., Nerad T.A., Visvesvara G.S. 2013. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60, 626–633
- Reyes-Batlle M., Todd C.D., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Cabello-Vilchez A.M., González A.C., Córdoba-Lanús E., Lindo J.F., Valladares B., Piñero J.E., Lorenzo-Morales J. 2014. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, 113, 1383–1388
- Schuster F.L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 342–354
- Stothard D.R., Schroeder-Diedrich J.M., Awwad M.H., Gast R.J., Ledee D.R., Rodríguez-Zaragoza S., Dean C.L., Fuerst P.A., Byers T.J. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 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. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739
- Todd C.D., Reyes-Batlle M., Martín-Navarro C.M., Dorta-Gorrín A., López-Arencibia A., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Valladares B., Lindo J.F., Lorenzo-Morales J. 2015. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from soil sources from Jamaica, West Indies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 416–421
- 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 Immunology and Medical Microbiology Reviews*, 50, 1–26
- Wagner C., Dorta A., Pérez de Galindo M.V., Galindo M., Nessi A., Vethencourt A., Bandes A., Guzmán de Rondón C. 2011. *Acanthamoeba* spp. in a brain biopsy of a patient with metastatic adenocarcinoma (*Hallazgo de Acanthamoeba spp en biopsia cerebral de un paciente con adenocarcinoma metastásico*). *Revista Instituto Nacional Higiene "Rafael Rangel"*, 42, 56–59

Received: June 15, 2016

Revised: June 29, 2016

Accepted for publication: June 30, 2016

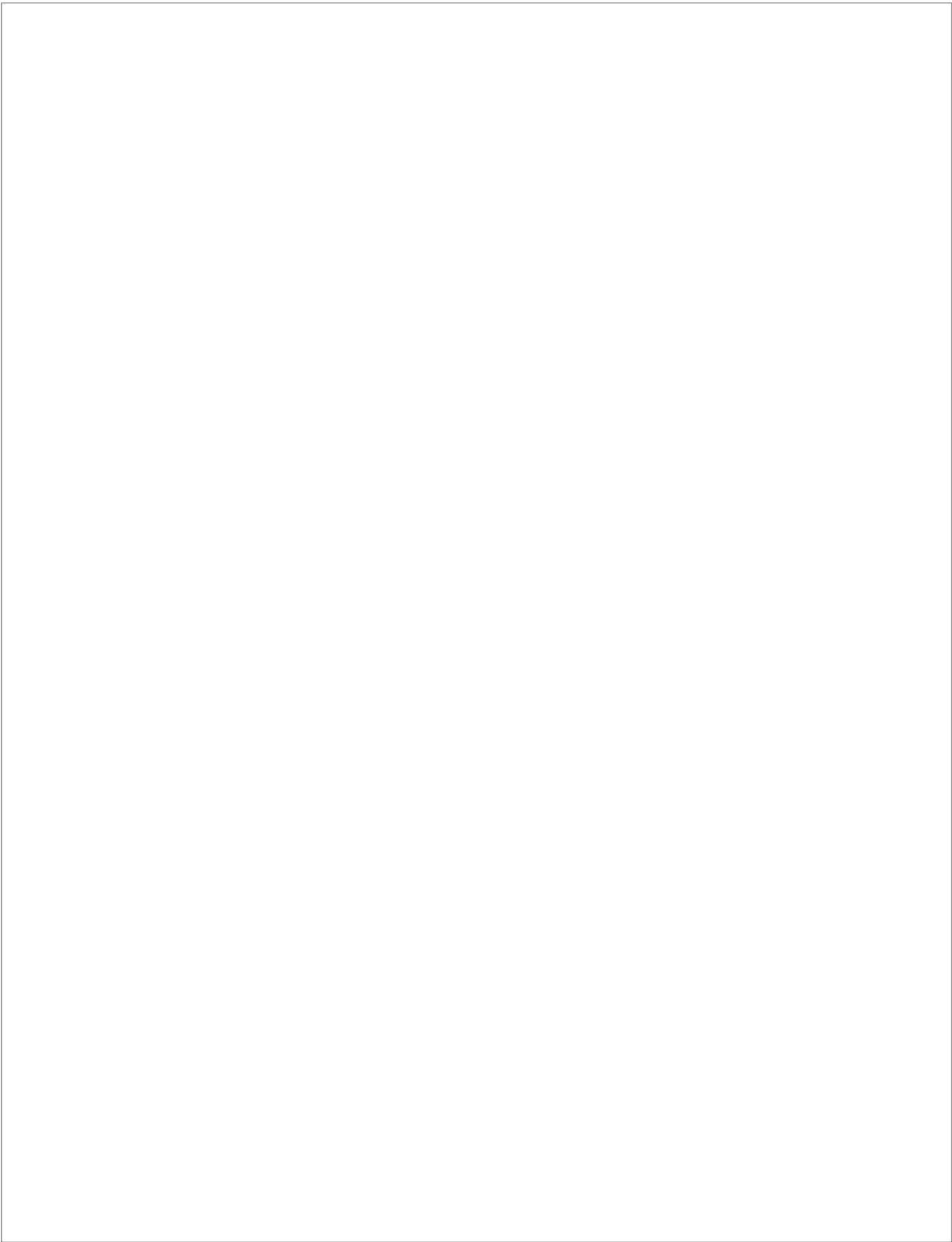
Brought to you by | Imperial College London
Authenticated
Download Date | 11/1/16 9:54 AM

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

Artículos publicados

Artículo 3:

Isolation of *Naegleria fowleri* from a domestic water tank associated with a fatal encephalitis in a 4 month-old Venezuelan child. *Tropical Biomedicine*, 34(2): 1–6.

Este estudio describe la asociación entre la contaminación del sistema del agua doméstico con la ameba de vida libre (AVL) patógena *Naegleria fowleri* y un caso fatal meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) en un niño procedente del estado Monagas en Venezuela. Las amebas fueron inicialmente identificadas por microscopía de una muestra de líquido ceforraquídeo (LCR) del niño y más tarde confirmadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)/secuenciación específica para *N. fowleri*. Con el fin de localizar la fuente de infección ambiental posible, se tomaron muestras del tanque del agua de la casa y también los cuerpos de agua de agua visitados recientemente por el niño y su familia y fueron examinados para detectar la presencia de *N. fowleri*, mediante cultivo y PCR/secuenciación. Los resultados obtenidos de las muestras de agua recogidas revelaron que sólo el tanque de agua de la casa resultó positivo para *N. fowleri*. La PCR y posterior secuenciación demostró que las cepas aisladas del paciente y el tanque de agua eran idénticas. Por lo tanto, fue confirmado el tanque de agua de la casa como la fuente de infección en este caso, posiblemente como resultado de la inmersión ocasional de la cabeza del niño bajo el agua, mientras se bañaba. Este caso resalta una nueva fuente de agua termalmente contaminada y otro factor de riesgo para la infección por *N. fowleri*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Isolation of *Naegleria fowleri* from a domestic water tank associated with a fatal encephalitis in a 4 month-old Venezuelan child

Wagner, C.^{1,2}, Vethencourt Ysea, M.A.², Galindo, P.M.V.², Guzmán De Rondón, C.², Nessi, P.A.P.², Reyes-Battle, M.¹, López-Arencibia, A.¹, Sifaoui, I.^{1,3}, Pérez De Galindo, M.V.², Martínez-Carretero, E.¹, Valladares, B.¹, Maciver, S.K.⁴, Piñero, J.E.¹ and Lorenzo-Morales, J.^{1*}

¹University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

²Laboratorio de Amibiasis-Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

⁴Centre for Integrative Physiology, University of Edinburgh, Scotland, UK

*Corresponding author e-mail: jmlorenz@ull.edu.es

Received 3 June 2016; received in revised form 9 September 2016; accepted 12 September 2016

Abstract. This study describes the association of household water system contamination with the pathogenic Free-Living Amoeba (FLA) *Naegleria fowleri* and a case of fatal Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM) in a child from the state of Monagas in Venezuela. Amoebae were initially identified by microscopy from a sample of cerebrospinal fluid (CSF) from the child. Direct DNA extraction and specific PCR/sequencing for *N. fowleri* was also carried out from the same CSF sample. In order to determine a possible environmental source of infection, water samples from the water tank of the child's home and also water bodies recently visited by the child and his family, were examined for the presence of *N. fowleri* by culture and PCR/sequencing. The results obtained from the collected water samples revealed that only the water tank of the house was positive for *N. fowleri*. PCR/sequencing showed that the strains isolated from the patient and the water tanks were 100 % identical. Therefore, the house water tank was confirmed as the source of infection in this case, possibly as a result of the occasional immersion of the child's head under the water while bathing. This case highlights a novel source of thermally polluted water and another threat of *N. fowleri* infection.

INTRODUCTION

Naegleria fowleri, a Free-Living Amoeba (FLA) species is distributed worldwide mostly in warm water related sources. This amoebic species is the causative agent of an acute and fatal disease known as Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM) [1]. *Naegleria fowleri* amoebae penetrates through the cribiform plate until it reaches the olfactory bulb of the central nervous system. The incubation period for PAM ranges from 5 to 7 days, and infection leads to death within a week. Onset of symptom is abrupt,

with bifrontal or bitemporal headaches, fever, and stiff neck, followed by nausea, vomiting, irritability, and fatigue. The mortality rate is as high as 95% with only a few cases of survival reported so far (Shenoy *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2013; Abrahams-Sandi *et al.*, 2015).

In the Americas, PAM cases have been reported in Venezuela, Brazil, Cuba, Mexico, Costa Rica and the United States where contact with heated water bodies is the main associated risk factor for infection (De Jonckheere, 2011; Abrahams-Sandi *et al.*, 2015). Venezuela has reported seven fatal

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

cases of PAM so far, although the isolation of the pathogen from the environment has not previously been achieved in any of these cases (García-Tamayo *et al.*, 1980; Rodríguez *et al.*, 1998; Ávila *et al.*, 2001; Cermeño *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2006; Caruzo and Cardozo, 2008; De Jonckheere, 2011). Nevertheless, the epidemiology of most reported cases of PAM indicates an association between recreational aquatic activity and infection. Swimming, diving, and immersion in hot springs, spas, and warm freshwater bodies have been related to *N. fowleri* infection (De Jonckheere, 2011; Moussa *et al.*, 2013).

In this work, the environmental isolation of a strain of *Naegleria fowleri* was achieved and associated to a fatal case of PAM in a 4-month old child in the state of Monagas in Venezuela by using culture and specific PCR/sequencing to confirm the amoebic identity. This is the first infection from a domestic water tank.

METHODS

Samples

CSF Sample

In May 2014, cerebrospinal fluid (CSF) from a 4 month-old boy who died 13 days previously was submitted to the Laboratorio de Amibiasis-Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela in order to check for the presence of FLA, as PAM was suspected to be the cause of the child's death. Since the sample of CSF was insufficient for both culture and PCR analyses, the sample was centrifuged and use directly for DNA extraction. Before using it for that purpose, CSF was centrifuged at 1000 rpm and the sediment observed at the microscope directly and after staining with Romanowski Giemsa.

Water samples

Water samples of 1 L volume from different places reported to be visited by the child and his family were collected in order to check for the presence of *N. fowleri*: 9 samples

from a large recreational swimming pool (1G to 9G); 4 samples from a pool for children (1P to 4P); 1 sample from the water storage tank of the child's house (1C); 3 samples from the main water supply of the child's neighborhood (1PS to 3PS) and 1 sample from a drinking water bottle used by the child's mother to bath him, 1B.

All samples mentioned above were filtered through 0.45-µm pore diameter nitrocellulose filter membranes using a vacuum manifold system. Each filter was cut in three pieces and placed over 2% Non-nutrient Agar (NNA) plates supplemented with a layer of heat killed *Escherichia coli*. After that plates were incubated at 26°C, 37°C and 42°C for 7 days and monitored daily. Amoebic strains which showed compatible morphology with *Naegleria* genus, grew at temperatures of 37°C and 40°C for 7 days and were positive for the enflagellation test, were then checked by specific PCR for *Naegleria fowleri*.

DNA extraction

DNA from CSF and cultures identified as putative *Naegleria* spp. strains by microscopy was extracted as previously described (Reyes-Battle *et al.*, 2014) by placing 1–2 ml of amoebic cultures directly into the Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell 16 Instrument as described in the Maxwell 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

Polymerase chain reaction (PCR) reaction and molecular characterization of isolates

For molecular identification of the genus *Naegleria*, the complete ITS region (ITS1, 5.8S, and ITS2) was amplified using the NFITSFW and NFITSRV primer pair which is specific for *N. fowleri* as previously described (Moussa *et al.*, 2013] which amplifies a fragment of around 300–400 bp depending on the species of *Naegleria*.

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Briefly, DNA amplification reactions were performed using a volume of 30 µl containing 40 ng template DNA, Buffer (1X) without MgCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2.5 pmol of each primer pair, and 1.25 units of Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, New Jersey), pH 8.3 was used for amplification in a Artik Cyler Thermocycler (Thermo Scientific). The cycling conditions were: initial denaturation of 95°C for two minutes; 35 repetitions of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing phase at 55°C for 1 minute and 30 seconds and elongation at 72°C for 2 minutes; and final elongation at 72°C for seven minutes. Amplification products were fractionated using 2% agarose electrophoresis stained with a solution of 20.000X of REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (Durviz, Madrid, Spain) and visualized under the UV light. A type strain from the American Type Culture Collection (ATCC) *Naegleria fowleri* ATCC 30894 was used as a positive control in the PCR reactions and distilled water added to the reaction mixture (instead of DNA) as the negative control.

The obtained PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a MEGABACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Barcelona, Spain) in the University of La Laguna Sequencing Service (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were obtained twice from both strands. The obtained sequences were aligned using Mega 5.0 software program (Tamura *et al.*, 2011). Moreover, nucleotide similarity search was performed by BLAST search (Basic Local Alignment search tool) of the sequenced amplicons against amoeba species.

RESULTS

Morphological examination

After direct examination of CSF sediment, degenerated host cells and other stationary structures without morphology suggestive of protozoa (Fig. 1A), fungi or bacteria were

observed. In Giemsa staining, lymphocytes and other mononuclear cells were detected. (Fig. 1B). Nevertheless, some suspicious structures with blunt pseudopodia and a nucleus with a large central karyosome were observed (Fig. 1C).

In the case of the tested water samples and after cultivation of all water samples in NNA plates, only the sample identified as 1C showed growth of amoebae at 26°C, 37°C and 42°C after a week. Observed amoebae presented a morphology compatible with *Naegleria* genus.

Molecular identification

PCR using the NFITSFW and NFITSRV primer pair specific for *Naegleria fowleri* was positive for the CSF and the water identified as 1C (Fig. 2). Moreover, nucleotide similarity search was performed by BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) of the sequenced amplicons which revealed more than 98% homology with other *N. fowleri* strains available in GenBank such as KT375442.1 and KF709536. Therefore, the presence of *N. fowleri* was confirmed both in the CSF and 1C samples, being both strains 100% identical in their sequence.

DISCUSSION

Naegleria fowleri infections are rare, however more than 95% of the cases are fatal. Most cases of PAM are related to contact with contaminated water bodies, water sports or other recreational activities requiring contact with warm water bodies (De Jonckheere, 2011; Abrahams-Sandi *et al.*, 2015).

In this study, a 4-month year old child was affected. This child from the state of Monagas in Venezuela, showed symptoms of PAM around 19 days after bathing with his family in a recreational swimming pool in this region. Patient's condition became worse and was then being admitted in hospital where he was administered antibiotics and corticoids but died at the hospital. CSF was collected and checked for the presence of any bacterial or viral agent but were negative in all cases. As

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

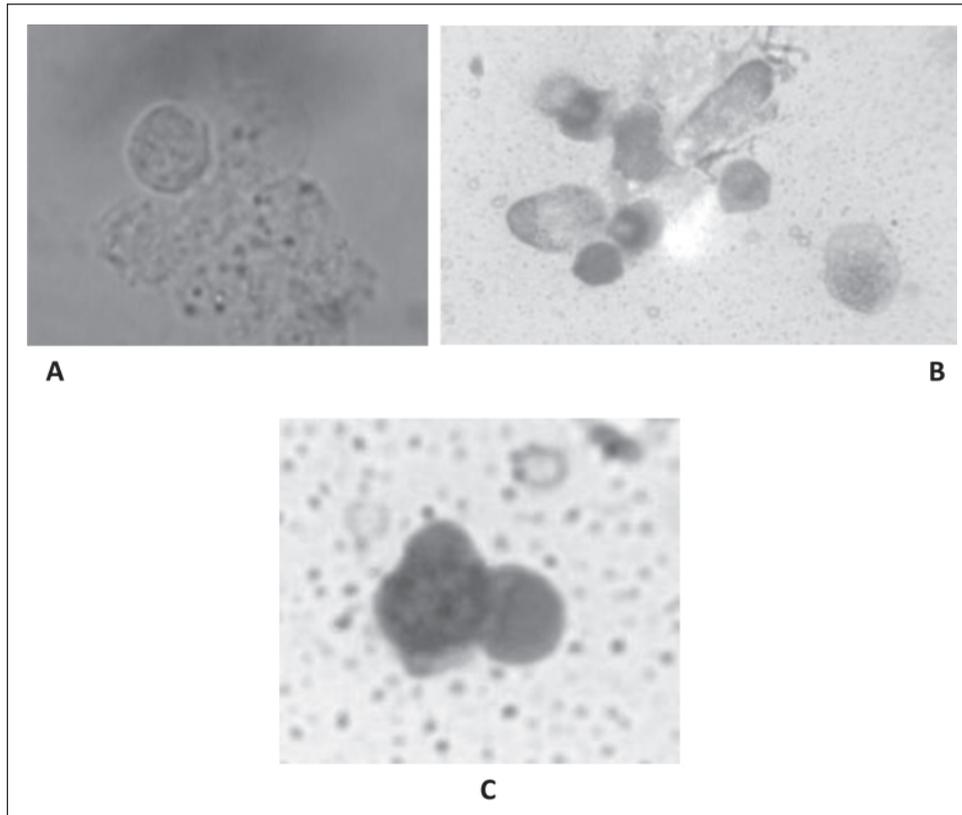


Figure 1. A) Degenerated cells, direct examination, 100 x. B) Mononuclear cells and lymphocytes, Giemsa staining, 40 x. C) Suspicious cell with blunt pseudopodia, Giemsa staining, 100 x.

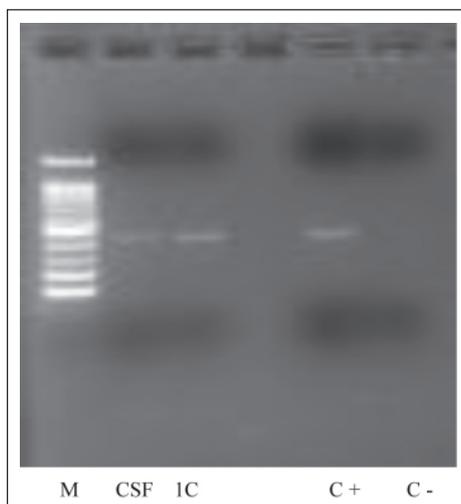


Figure 2. *Naegleria fowleri* PCR for CSF sample and water sample 1C.

it was mentioned above, microscopy and direct DNA extraction and further PCR/DNA sequencing revealed that the CSF was positive for the presence of *Naegleria fowleri*. Nevertheless, it is important to mention that the CSF sample analyzed for the presence of *Naegleria fowleri* was 13-day old which was kept at 4°C until it reached our laboratory. Therefore, even though amoebic forms were observed under the microscope, it should be noted that in such conditions not viable amoebic forms were kept. The only possible approach with such material was to try to identify amoebic DNA. Storage conditions however, may affect the quality of DNA and subsequently have impact on amplification and BLAST analysis since only 98% of homology was observed in the obtained sequences when compared to the

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

available ones in Genbank. When a case of PAM is suspected, CSF should be collected and processed for microscopy and PCR/sequencing as soon as possible in order to avoid issues such as the ones described in this study.

In the case reported in this study, the patient's mother reported to have recently visited a swimming pool in a hotel nearby their home. Therefore, samples were collected from the water sources of this hotel and also from the patient's house in order to elucidate the infection source. After performance of culture and specific PCR, only the water sample collected in the patient's house was positive for *Naegleria fowleri* (sample 1C). Interestingly, the water source from the house was reported to be chlorinated enough to be able to be used for household purposes which highlights an important epidemiological data in cases of PAM as previously reported (Abrahams-Sandi *et al.*, 2015). Moreover, this is the first time that the environmental infection source of PAM has been identified from the 7 previously reported cases of this infection in Venezuela (García-Tamayo *et al.*, 1980; Rodríguez *et al.*, 1998; Ávila *et al.*, 2001; Cermeño *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2006; Caruzo *et al.*, 2008, De Jonckheere, 2011).

Although we believe this is the first case of PAM where the source of infection has proven to be a domestic water tank, cases of other FLA infections such as *Acanthamoeba* keratitis from a domestic water supply are known (Jeong and Yu, 2005). Nevertheless, the present case is rather different in that *N. fowleri* requires constant warm water otherwise other FLA could grow and compete for the habitat (Griffin, 1983). Importantly, the water tank source in the present case was exposed to the sun becoming warm constantly which may have encouraged the specific growth of *N. fowleri* and the reported infection with a fatal end.

CONCLUSIONS

In the current study, both the environmental source of infection and the pathogen in the patient were isolated and identified by morphological and molecular methods. To the best of our knowledge, this is the first time that the epidemiology of a case of infection by *N. fowleri* is achieved in Venezuela and the first where the source was the domestic water tank anywhere. Awareness should be risen in the region in order to check municipal water sources and avoid further cases of PAM in the area in general and more specifically domestic water tanks should be protected against becoming warm for extended periods.

Acknowledgements. This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain and the Project FIS PI13/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III and Project refs. BIO24 and from Fundación CajaCanarias. CWA was supported by a grant from Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico -Universidad Central de Venezuela (Becario Exterior 2014-2015). MRB was funded by Fundación CajaCanarias para Posgraduados de la Universidad de La Laguna. Convocatoria 2014. IS and ALA were supported by Agustín de Betancourt Programme.

Declaration of Interest. None

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

REFERENCES

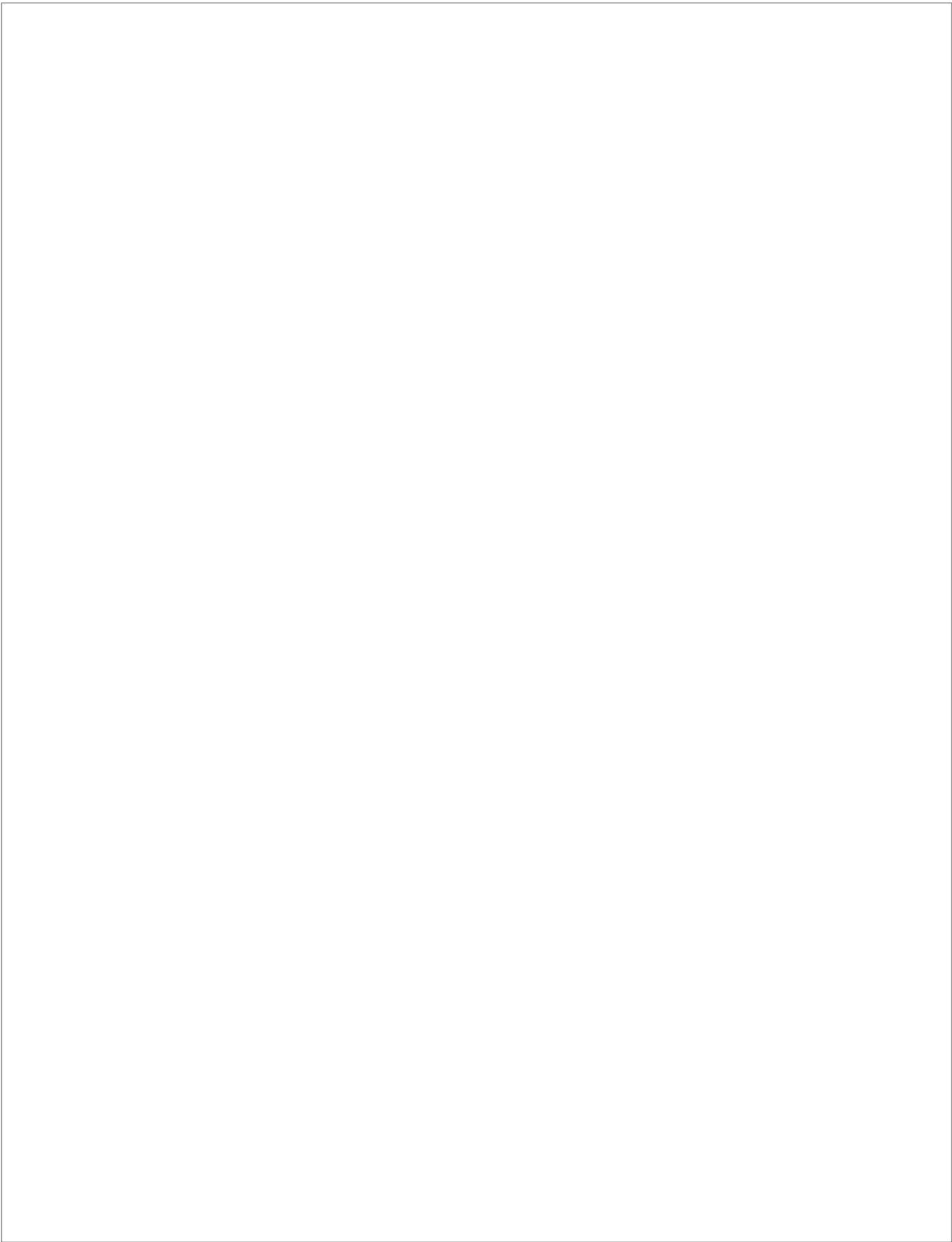
- Abrahams-Sandí, E., Retana-Moreira, L., Castro-Castillo, A., Reyes-Batlle, M. & Lorenzo-Morales, J. (2015). Fatal meningoencephalitis in a child and isolation of *Naegleria fowleri* from hot springs in Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases* **21**: 382-4.
- Ávila, J., Rodríguez, G., Infantes, D., Álvarez, O. & Briceño, M. (2001). Presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque Las Cocuizas-Maracay-Edo. Aragua-Venezuela. *Revista Talleres* **7**: 136.
- Caruzo, G. & Cardozo, J. (2008). Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela. *Tropical Doctor* **38**: 256-7.
- Cermeño, J.R., Hernández, I., El Yasin, H., Tinedo, R., Sánchez, R., Pérez, G., Gravano, R. & Ruiz, A. (2006). Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: epidemiological study in Anzoategui state, Venezuela. *Revista Da Sociedade Brasileira Da Medicina Tropical* **39**: 264-8.
- De Jonckheere, J.F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution* **11**: 1520-8.
- García-Tamayo, J., González, J.E. & Martínez, A.J. (1980). Meningoencefalitis amibiana primaria and encefalitis granulomatosa amibiana. Estudio comparativo de dos casos venezolanos. *Acta Medica Venezuelana* **27**: 84-91.
- Griffin, J. (1983). The Pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Environmental Isolations, Competitors, Ecologic Interactions, and the Flagellate-Empty Habitat Hypothesis. *Journal of Protozoology* **30**(2): 403-9.
- Jeong, H.J. & Yu, H.S. (2005). The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean Journal of Parasitology* **43**(2): 47-50.
- Moussa, M., De Jonckheere, J.F., Guerlotté, J., Richard, V., Bastarud, A., Romana, M. & Talarmin, A. (2013). A Survey of *Naegleria fowleri* in geothermal recreational waters of Guadeloupe (French West Indies). *PLoS One* **8**: e54414.
- Petit, F., Vilchez, V., Torres, G., Molina, O., Dorfman, S., Mora, E. & Cardozo, J. (2006). Primary amoebic meningoencephalitis: two new cases report from Venezuela. *Archivos de Neuro-Psiquiatria* **64**: 1043-6.
- Reyes-Batlle, M., Todd, C.D., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A.M., González, A.C., Córdoba-Lanús, E. *et al.* (2014). Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research* **113**: 1383-8.
- Rodríguez, R., Méndez, O., Molina-Viloria, O.M., Luzardo, G., Martínez, A., Visvesvara, G. & Cardozo, J.J. (1998). Infección del Sistema Nervioso Central por amebas de vida libre: Comunicación de tres nuevos casos venezolanos. *Revista Neurología* **26**: 1005-8.
- Shenoy, S., Wilson, G., Prashanth, H.V., Vidyalakshmi, K., Dhanashree, B. & Bharath, R. (2002). Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: first reported case from Mangalore, South India. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 309-10.
- 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. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-9.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

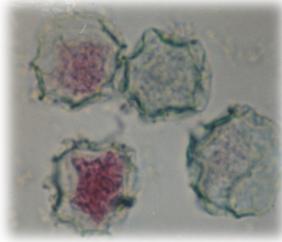


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25



CONCLUSIONES

“Una meta es un sueño con fecha de entrega”

Napoleón Gil

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

CONCLUSIONES.

1. Se describe por primera vez la presencia del género *Acanthamoeba* en suelos del estado Bolívar, en áreas con población mixta: indígena, criolla y turística.
2. *Acanthamoeba* T4 es el genotipo predominante en los suelos evaluados del estado Bolívar, con la cual, la población expuesta a estos suelos podría estar en riesgo de infecciones por este genotipo
3. Es la primera vez que se caracterizan a nivel molecular, los genotipos de *Acanthamoeba* en muestras procedentes o relacionadas con casos clínicos en Venezuela. El genotipo T4 de *Acanthamoeba* fue el genotipo prevalente en la totalidad de las muestras evaluadas, lo que parece indicar que, junto al resultado del estudio de los suelos, es el genotipo patógeno prevalente en el país.
4. Por primera vez en Venezuela, se describe la asociación entre un aislado de *N. fowleri* procedente de una fuente de agua doméstica y un caso fatal meningoencefalitis primaria amebiana (MAP).
5. La contaminación termal del sistema del agua doméstico con AVL patógenas como *N. fowleri*, descrita en este trabajo, se perfila como un nuevo riesgo para la adquisición de una MAP.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Conclusiones

6. Al ampliarse con este trabajo la información epidemiológica sobre las infecciones por AVL en Venezuela, se hace necesario la implementación de una metodología diagnóstica completa, así como preparación del personal médico y de diagnóstico, en las instituciones de salud pública y privada, para la detección temprana y la aplicación de tratamientos oportunos para estas infecciones.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

“El mejor guerrero no es el que triunfa siempre, sino el que vuelve sin miedo a la batalla”.

Dolores Ibárruri

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abedkhozasteh H, Niyiyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S & Rezaeian M. (2013). First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(3): 481-485.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW & Taylor MF. (2005). The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399-451.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A & Spiegel FW. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5): 429-493.
- Aichelburg AC, Walochnik J, Assadian O, Prosch H, Steuer A, Pernecky G, Visvesvara GS, Aspöck H & Vetter N (2008). Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. *Emerging infectious diseases*, 14(11): 1743-1746.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Aimard L, Brasseur P, Favennec L, Perrine D, Watt L & Brasseur G. (1998). Amebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella* species. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 187–188.
- Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR & Seal DV. (1996). Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology*, 103:485-494.
- Alexandrakis G, Miller D, Huang AJ.(1998). Amebic keratitis due to *Vahlkampfia* infection following corneal trauma. *Archives of Ophthalmology*. 116(7): 950-951.
- Alves D de S, Moraes AS, Alves LM, Gurgel-Gonçalves R, Lino Junior Rde S, Cuba-Cuba CA & Vinaud MC. (2016). Experimental infection of T4 *Acanthamoeba* genotype determines the pathogenic potential. *Parasitology Research*, 115(9): 3435-3440.
- Anane S, Ben Ayed N, Malek I, Nacef L, Kaouech E, Belhadj S, Ayed S, Kallel K & Chake E.(2008). La ke' ratite amibienne : il faut y penser. *Cahiers Santé*, 18(4): 209-2013. Recuperado el 13 de Marzo de 2017, de: http://www.jle.com/download/san-281837-la_keratite_amibienne_il_faut_y_penser-laguna_salud-WMbSJH8AAQEAAABzoSykAAAAM-u.pdf
- Anderson OR, Rogerson, A & Hannah F. (1997). Three new limax amoebae isolated from marine surface sediments: *Vahlkampfia caledonica* N. Sp., *Saccamoeba marina* N. sp., and *Hartmannella vacuolata* N.Sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(1): 33-42.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Arnalich-Montiel F, Lorenzo-Morales J, Irigoyen C, Morcillo-Laiz R, López-Vélez R, Muñoz-Negrete F, Piñero JE & Valladares B. (2013). Co-isolation of *Vahlkampfia* and *Acanthamoeba* in *Acanthamoeba*-like keratitis in a Spanish population. *Cornea*, 32(5): 608-614.
- Ávila I, Rodríguez de G M, Infante D, Llovera V, Álvarez O & Briceño M.(2006). Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 58(1): 19-24.
- Baig AM. (2015). Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an “inside job” done by the host immune response? *Acta Tropica*, 148: 72-76.
- Balczun C & Scheid PL. (2016). Detection of *Balamuthia mandrillaris* DNA in the storage case of contact lenses in Germany. *Parasitology Research*, 115(5): 2111-2114.
- Bermúdez A., Díaz O., Pérez MV & Pérez E. (1993). *Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas). *Anales del Instituto Barraquer (Barcelona)*, 24: 63–68.
- Bermúdez A, Pérez de Galindo MV, Martínez YM, Pérez E & Nieto T. (1998). Identificación de *Acanthamoeba* spp .en tres pacientes con conjuntivitis. *Anales del Instituto Barraquer (Barcelona)*, 27: 157-163.
- Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ & Fuerst PA. (2003) Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(1): 65-69.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1621-1625.
- Bouchoucha I, Aziz A, Hoffart L & Drancourt M. (2016). Repertoire of free-living protozoa in contact lens solutions. *BioMed Central Ophthalmology*, 16(1): 191-195.
- Brass K (1972). Primary amebic meningoencephalitis. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 97(51):1983-1985.
- Bravo FG & Seas C. (2012). *Balamuthia mandrillaris* amoebic encephalitis: an emerging parasitic infection. *Current infectious disease reports*, 14(4): 391-396.
- Bravo FG, Alvarez PJ & Gotuzzo E. (2011). *Balamuthia mandrillaris* infection of the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24: 112–117.
- Brown S & De Jonckheere JF. (1999). A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSUrDNA sequences. *European Journal of Protistology* 35:49–54.
- Brown S & De Jonckheere JF. (2004). Isolation of a new vahlkampfiid amoeba from soil: *Paravahlkampfia lenta* n. sp. *European Journal of Protistology* 40, 289–294.
- Cabello-Vílchez AM, Mena R, Zuñiga J, Cermeño P, Martín-Navarro CM, González AC, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, Piñero JE, Valladares B & Lorenzo-Morales J. (2014). Endosymbiotic *Mycobacterium chelonae* in a *Vermamoeba vermiformis* strain isolated from the nasal mucosa of an HIV patient in Lima, Perú. *Experimental Parasitology*, 145: S127–S130.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Cabello-Vílchez AM. (2015). *Balamuthia mandrillaris* en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Infectio*, 20(2): 107-119.
- Cable BL & John DT. (1986). Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *Journal of Protozoology*, 33(4): 467-472.
- Cary LC, Maul E, Potter C, Wong P, Nelson PT & Robertson W Jr. (2010). *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis: survival of a pediatric patient. *Pediatrics*, 125: 699–703.
- Carrijo-Carvalho LC, Sant'ana VP, Foronda AS, de Freitas D & de Souza Carvalho FR. (2017). Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. *Survey of ophthalmology*, 62(2):203-218
- Castrillón JC & Orozco LP. (2013) *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Revista Chilena de Infectología*, 30(2): 147-155.
- Center for Diseases Control (2012). Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 61 (1): 1-103. Recuperado el 13 de Marzo de 2017, de: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm>
- Center for Diseases Control (CDC) – DPDx (2017). Free Living Amebic Infections. *Cdc.gov*. Recuperado el 15 de Febrero de 2017, de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>
- Centeno M, Rivera F, Cerva L, Tsutsumi V, Gallegos E, Calderón A, Ortiz R, Bonilla P, Ramírez E & Suárez G. (1996). *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research*, 27(4): 579–586.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Cermeño JR, Hernández I, El Yasin H, Tinedo R, Sánchez R, Pérez G, Gravano R & Ruiz A. (2006). Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Epidemiological study in Anzoátegui State, Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(3): 264-268.
- Cerva L & Nova'k K. (1968). Amebic meningoencephalitis 16 fatalities. *Science*, 160:92.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M & Rott MB.(2015). *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*, 114: 2481–2490.
- Corsaro D, Wylezich C, Walochnik J, Venditti D & Michel R. (2017-a). Molecular identification of bacterial endosymbionts of *Sappinia* strains. *Parasitology Research*. 116(2): 549-558.
- Corsaro D, Köhler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, Berrilli F & Walochnik J.(2017-b). Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitology Research*, 116(4):1273-1284.
- Culbertson CG, Smith JW & Minner JR. (1958). *Acanthamoeba*: observation on animal pathogenicity. *Science*, 127: 1506.
- da Rocha-Azevedo B, Tanowitz H & Marciano-Cabral F. (2009). Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009: 1-14.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 681–685.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- De Jonckheere JF. (1998). Sequence Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers, including the 5.8S rDNA, of *Naegleria* spp. *Protist*, 149(3): 221-228.
- De Jonckheere JF. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica*, 41: 309–342.
- De Jonckheere, JF (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7): 1520-1528.
- De Jonckheere JF. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*, 145: S2-S9.
- De Jonckheere JF. (2017). *Tree of life web project*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <http://tolweb.org/Heterolobosea/96360Vahlkampfia%20signyensis>.
- De Jonckheere JF & Brown S. (1998-a). There is no evidence that the free-living ameba *Hartmannella* is a human parasite. *Clinical of Infectious Disease*, 26(3): 773.
- De Jonckheere JF & Brown S. (1998-b). Is the free-living ameba *Hartmannella* causing keratitis? *Clinical of Infectious Disease*, 27(5):1337-1338.
- De Jonckheere JF & Brown S. (1998-c). Non-*Acanthamoeba* amoeba infection. *The Journal of infection*, 36: 349–350.
- De Jonckheere JF & Brown S. (1999). Non-*Acanthamoeba* amoebic keratitis. *Cornea*, 18: 499–501.
- De Jonckheere JF & Brown S. (2005). The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist*, 156(1): 89-96.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- De Jonckheere JF, Brown S, Dobson PJ, Robinson BS & Pernin P. (2001). The amoeba-to flagellate transformation test is not reliable for the diagnosis of the genus *Naegleria*. Description of three new *Naegleria* spp. *Protist*, 152: 115–121.
- Deetz TR, Sawyer MH, Billman G, Schuster FL & Visvesvara GS. (2003). Successful treatment of *Balamuthia* amoebic encephalitis: presentation of 2 cases. *Clinical of Infectious Diseases*, 37: 1304–1312.
- Derrick EH. (1948). A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoon closely resembling, Eif not identical with *Iodamoeba buetschlii*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 191-198.
- Díaz O & Bermúdez A. (1993). *Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas. *Boletín INDIO*, 10: 2734.
- Dillon A, Achilles-Day U, Singhrao S K, Pearce Mark, Glyn Morton L H & Crean SJ. (2014) Biocide sensitivity of *Vermamoeba vermiformis* isolated from dental-unit-waterline systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88: 97-105.
- Dini LA, Cockinos C, Frea JA, Niszl IA & Markus MB. (2000). Unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a contact lens wearer from Gauteng, South Africa. *Journal of Clinical Microbiology* 38(2): 826-829.
- dos Santos Gomes TS, Magnet A, Izquierdo F, Vaccaro L, Redondo F, Bueno S, Sánchez ML, Angulo S, Fenoy S, Hurtado C & Del Aguila C. (2016). *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. *PLoS One*. 22; 11(4): 1-12.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Doyle JS, Campbell E, Fuller A, Spelman DW, Cameron R, Malham G, Gin D & Lewin SR. (2011). *Balamuthia mandrillaris* brain abscess successfully treated with complete surgical excision and prolonged combination antimicrobial therapy. *Journal of Neurosurgery*, 114: 458–462.
- DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. (2017). CDC - DPDx - Free Living Amebic Infections. (2017). *Cdc.gov*. Recuperado el 15 de Febrero de 2017, de: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>.
- Dunn AL, Reed T, Stewart C & Levy RA. (2016). *Naegleria fowleri* that induces Primary Amoebic Meningoencephalitis: Rapid diagnosis and rare Case of survival in a 12-year-old caucasian girl. *Laboratory Medicine*, 47(2): 149-154.
- Etnia E'ñepá o Panare. (2017). *Es.wikipedia.org*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: https://es.wikipedia.org/wiki/Etnia_E'ñepá_o_Panare.
- Fernández Rodrigo, MT. (2015). Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la salud pública (Tesis doctoral de la Universidad de Zaragoza). Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zagan. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <https://zagan.unizar.es/record/30662?ln=es>.
- Fields BS, Nerad TA, Sawyer TK, King CH, Barbaree JM, Martin WT, Morrill WE & Sanden GN. (1990). Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *Journal of Protozoology*, 37(6): 581–583.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Fouque E, Trouilhé MC, Thomas V, Hartemann P, Rodier MH & Héchara Y. (2012). Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. *Eukaryotic Cell*, 11(4): 382–387.
- Fowler M & Carter RF. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *British Medical Journal*, 2: 740-742.
- Fuerst PA, Booton GC & Crary M. (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62: 69–84.
- Galindo M, Vethencourt MA, Nessi A, Conde C, Luongo V, Machado R, Ugarte A, Pérez de Galindo MV, Wagner C & Guzmán de Rondón C. (2016). Identificación de aislados de *Acanthamoeba* spp mantenidos en el laboratorio de amibiasis-UCV, mediante PCR-RFLP. *VITAE Academia Biomédica Digital*. 65. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=122&n=5254>
- García LS. (1997). Classification of human parasites. *Clinical Infectious Diseases*, 25:21–23.
- García JA, Ávila E, Villasmil G, Russian C, Redondo C, Núñez MJ, Pérez E & Ríos A. (1997). Meningoencefalitis crónica por *Acanthamoeba* spp. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Boletín Venezolano de Infectología*, 7(1): 9-13.
- García-Tamayo J, González J & Martínez AJ. (1980). Meningoencefalitis amibiana primaria y Encefalitis Granulomatosa Amibiana. Estudio comparativo de dos casos venezolanos. *Acta Médica Venezolana*, 27: 84-91.
- Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA & Byers TJ. (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43: 498-504.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Gelman BB, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf SJ, Nauta HW & Visvesvara GS. (2003). Neuropathological and ultrastructural features of amoebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62: 990–998.
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Bokowski J, Chljud G, Nauta HW & Visvesvara GS. (2001). Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *Journal of the American Medical Association*, 285: 2450–541.
- González-Alfonzo JE, Martínez AJ, García V, García-Tamayo J & Céspedes G. (1991). Granulomatous encephalitis due to a leptomycid amoeba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4): 480.
- González-Fernández, AJ. (2012). Sistema alimentario de una comunidad indígena Panare del río Maniapure, estado Bolívar, Venezuela. Centro de Investigación y Manejo de Fauna MANFAUNA, Guanare. pp 186.
- González-Robles A, Salazar-Villatoro L, González-Lázaro M, Omaña-Molina M & Martínez-Palomo A. (2012). *Vahlkampfia* sp.: structural observations of cultured trophozoites. *Experimental Parasitology*, 130(1): 86-90.
- Goswick SM & Brenner GM. (2003). Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri* *in vitro* and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *Journal of Parasitology*, 89: 837–842.
- Griffin, JL. (1972). Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science*, 178: 869-870.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, Peralta JM & Peralta RH. (2016). *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiological Research*, 193: 30-38.
- Hajjalilo E, Niyayati M, SolaymanI M & Rezaeian M. (2015). Pathogenic Free-Living Amoebae Isolated From Contact Lenses of Keratitis Patients. *Iran Journal of Parasitology*, 10 (4): 541-546.
- Hay J, Seal DV & Kirkness CM. (1996). *Non-Acanthamoeba* Amoebic Keratitis. *The Journal of infection*, 34(1): 89-91.
- Henley, P. (1982). *The Panare: Tradition and Change on the Amazonian Frontier*. Yale University Press, New Haven and London. pp.263
- Hogue, MJ. (1914). Studies in the life history of an amoeba of the limax group *Vahlkampfia calkinsi*. *Archiv für Protistenkunde*, 35: 154-163.
- Huber O & Zent S. (1995). Indigenous people and vegetation in the venezuelan guayana: some ecological considerations. *Scientia Guaianæ*, Caracas (Venezuela), 5: 37-64 .
- Instituto Nacional de Estadística, República Bolivariana de Venezuela. (09/08/2012). Censo 2011- Resultados Básicos (pdf). *Ine.gob.ve*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <http://www.ine.gob.ve/documentos/Demografia/CensodePoblacionyVivienda/pdf/ResultadosBasicosCenso2011.pdf>.
- Instituto Nacional de Estadística, República Bolivariana de Venezuela. (2011). Mapa división político territorial de Venezuela. Entidades federales. *Ine.gob.ve*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: http://www.ine.gob.ve/images/Ambiental/PrincIndicadores/68_001.png.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Instituto Nacional de Estadística, República Bolivariana de Venezuela (2011). Informe geoambiental estado Bolívar 2011 (pdf). *Ine.gob.ve*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de:http://www.ine.gov.ve/documentos/Ambiental/PrincIndicadores/pdf/Informe_Geoambiental_Bolivar.pdf
- Jung S, Schelper RL, Visvesvara GS & Chang HT. (2004). *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an unusual clinical course and a favorable outcome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 128: 466-468.
- Kennedy SM, Devine P, Hurley C, Ooi YS & Collum LM. (1995). Corneal infection associated with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. *Lancet*, 46 (8975): 637-638.
- Khan NA. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 564–595.
- Khan NA, Jarroll EL & Paget TA. (2001). *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology*, 43(3): 204-208.
- Khan NA, Jarroll EL & Paget TA. (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 45(3):197-202.
- Khan NA, Ong TY & Siddiqui R. (2017). Targeting Brain-Eating Amoebae Infections. *American Chemical Society, Neuroscience*. 22.
- Khandelwal S. (2016). Essay on Protozoa- Zoology. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <http://www.biologydiscussion.com/essay/essay-on-protozoa-zoology/25001>.
- Kiderlen, AF, Radam E & Lewin A. (2008). Detection of *Balamuthia mandrillaris* DNA by real-time PCR targeting the RNase P gene. *BioMed Central Microbiology*, 8: 210.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Kiderlen AF, Radam E & Tata PS. (2009). Assessment of *Balamuthia mandrillaris*-specific serum antibody concentrations by flow cytometry. *Parasitology Research*, 104(3): 663–670.
- Klieščíková J. (2013). Life cycle of the free-living amoebae: Study of encystation of *Balamuthia* and *Acanthamoeba*. Charles University in Prague 1st Faculty of Medicine. (Summary of the Ph.D. thesis). Recuperado el 17 de Febrero de 201, de: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/.../canmedaj01600-0028.pdf.
- Krasaelap A, Prechawit S, Chansaenroj J, Punyahotra P, Puthanakit T, Chomtho K, Shuangshoti S, Amornfa J & Poovorawan Y. (2013). Fatal *Balamuthia* amebic encephalitis in a healthy child: a case report with review of survival cases. *Korean Journal of Parasitology*, 51: 335–341
- Kuiper MW, Valster RM, Wullings BA, Boonstra H, Smidt H & van der Kooij D. (2006). Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 72(9): 5750-5756.
- Kulsoom H, Baig AM, Siddiqui R & Khan NA. (2014). Combined drug therapy in the management of granulomatous amoebic encephalitis due to *Acanthamoeba* spp., and *Balamuthia mandrillaris*. *Experimental Parasitology*, 145 Suppl: S 115-120.
- Latifi AR, Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Haghighi A, Tabaei SJ, Lasjerdi Z & Azargashb E. (2017). Occurrence of Naegleria species in therapeutic geothermal water sources, Northern Iran. *Acta Parasitologica*, 62(1):104-109.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Lim N, Goh D, Bunce C, Xing W, Fraenkel G, Poole TR & Ficker L. (2008). Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *American Journal of Ophthalmology*, 145: 130–135.
- Locomotion Exhibited by Protozoans*. (2017). *Biology Discussion*. Recuperado el 15 de Febrero de 2017, de: <http://www.biologydiscussion.com/animals-2/phylum-protzoa/locomotion-exhibited-by-protzoans/32569>.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA & Walochnik J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22, 10.
- Lorenzo-Morales J, Coronado-Álvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Valladares B. (2007-a). Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(4):753-756.
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel A, Piñero JE & Valladares B. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology: Cell Press*, 29(4): 181-187.
- Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jiménez C, Tejedor ML, Valladares B & Ortega-Rivas A. (2005). Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12(2): 233-236.
- Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J & Valladares B. (2007-b). Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitology Research*, 102: 167-169.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Lorenzo-Morales J, Klieščiková J, Martínez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A & Valladares B. (2008). Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryotic Cell*, 7(3): 509-517.
- Lorenzo-Morales J, Morcillo-Laiz R, Martín-Navarro CM, López-Vélez R, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Maciver SK, Valladares B & Martínez-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.
- McKellar MS, Mehta LR, Greenlee JE, Hale DC, Booton GC, Kelly DJ, Fuerst PA, Sriram R & Visvesvara GS.(2006). Fatal granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, *in vitro* culture, immunofluorescence analysis and molecular analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11): 4265-4269.
- Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S & del Aguila C. (2014). Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology Research*, 113: 2845-2850.
- Mahittikorn A, Kittichathanakul T, To-Im J, & Nacapunchai D. (2016). Knowledge, Behavior, and Free-Living Amoebae Contamination of Cosmetic Contact Lens Among University Wearers in Thailand: A Cross-Sectional Study. *Eye & Contact Lens*, 0: 1–8.
- Marciano-Cabral F & Cabral G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2): 273-307.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Marciano-Cabral F & Cabral G. (2007). The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51: 243–259.
- Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Sifaoui I, Reyes-Batlle M, Valladares B, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Maciver SK & Lorenzo-Morales J. (2015). Statins and voriconazole induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 59(5): 2817-2824.
- Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Machin RP, López-Arencibia A, García-Castellano JM, de Fuentes I, Loftus B, Maciver SK, Valladares B & Piñero JE. (2013). Inhibition of HMG-CoA reductase and the application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1): 375–381.
- Martínez AJ. (1985). Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Martínez AJ & Visvesvara GS. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*, 7:583-98.
- Martínez AJ, Guerra AE, García-Tamayo J, Céspedes G, González-Alfonzo JE & Visvesvara GS. (1994). Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathologica*, 87(4): 430-434.
- Martínez, DY. (2010) Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. *Clinical Infectious Diseases*, 51: 7–11.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Martínez DY, Seas C, Bravo F, Legua P, Ramos C, Cabello AM & Gotuzzo E. (2010). Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. *Clinical Infectious Diseases*, 51: e7–e11.
- Matin A, Siddiqui R, Jayasekera S & Khan NA. (2008). Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3): 435–448
- Mella C, Medina G, Flores-Martin S, Toledo Z, Simaluiza RJ, Pérez-Pérez G & Fernández H. (2016). Interaction between zoonotic bacteria and free living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance?. *Archives of Veterinary Medical*, 48: 1-10.
- Michel R, Wylezich C, Haurader B & Smirnov AV. (2006/7). Phylogenetic position and notes on the ultrastructure of *Sappinia diploidea* (Thecamoebidae). *Protistology* 4 (4): 319-325.
- Moreno E, Solarte Y & Scorza JV. (1991). Amibas con parasitismo facultativo en aguas termales de Trujillo, Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Salud Ambiental*, 31: 22-26.
- Morgan MJ, Halstrom S, Wylie JT, Walsh T, Kaksonen AH, Sutton D, Braun K & Puzon GJ. (2016). Characterization of drinking water distribution pipeline terminally colonized by *Naegleria fowleri*. *Environmental Science and Technology*, 50(6):2890-2898.
- Municipio Cedeño (Bolívar). (2017). *Es.wikipedia.org*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de [https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_Cedeño_\(Bolívar\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_Cedeño_(Bolívar)).
- Naegleria gruberi* | Microworld. (2017). *Arcella.nl*. Recuperado el 17 de Febrero de 2017 de <http://www.arcella.nl/naegleria-gruberi>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Nicholls CL, Parsonson F, Gray L. EK, Heyer A, Donohue S, Wiseman G & Norton R. (2016). Primary amoebic meningoencephalitis in North Queensland: the paediatric experience. *Medical Journal of Australia*, 205 (7): 1-4.
- Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaeian M, Martín-Navarro CM, Haghi AM, Maciver SK & Valladares B (2009). Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitology Research*, 106(1): 279-281.
- Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebbali M, Maghsood AH, Farnia S, Valladares B & Rezaeian M. (2010). First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Experimental Parasitology*, 126(1): 89–90.
- Nuprasert W, Putapornpip C, Pariyakanok L & Jongwutiwes S. (2010). Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 4636-4640.
- Oddó D. (2006) Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*, 23(3): 200-214.
- Oddó D, Ciani S & Vial P. (2006). Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*. Primer caso diagnosticado en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 23 (3): 232-236.
- Omaña-Molina M, Vanzzini-Zago V, Hernández-Martínez D, González-Robles A, Salazar-Villatoro L, Ramírez-Flores E, Oregón, Lorenzo-Morales J & Martínez- Palomo A. (2016). *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. *Parasitology Research*, 115(2): 873-878.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Organización de Las Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación – Roma Dirección del Centro de Inversiones, Corporación Andina de Fomento (CAF) (2006) Venezuela. Nota de Análisis Sectorial Agricultura y Desarrollo Rural (PDF). Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/ak170s/ak170s00.pdf>.
- Orrego-Puelles E, Casavilca S, Rodríguez FJ, Pritt BS, Castillo M & Castañeda CA.(2015). Amebiasis of the central nervous system: report of six cases in Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(3): 591-597.
- Ozkoc S, Tuncay S, Delibas SB, Akisu C, Ozbek Z, Durak I & Walochnik J. (2008). Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp.from two clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 3):392-396.
- Page FC. (1967-a). Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Harmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *Journal of Protozoology*, 14: 499-521.
- Page FC. (1967-b). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *Journal of Protozoology*, 14:709–724.
- Page FC. (1974). A further study of taxonomic criteria for *Limax* amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Archiv für Protistenkunde*, 116: 149.
- Page FC. (1976). An Illustrated key to freshwater and soil amoebae. Freshwater biological association, scientific publication N°34. The Ferry house, Ambleside, Cumbria LA22 oLP. Titus Wilson&Son Ltd. ISSN 0367-1887.
- Page FC. (1988). A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater, Biological Association. UK: *Ambleside Cumbria*, 122.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Park SJ. (2016). First Record of Potentially Pathogenic Amoeba *Vermamoeba vermiformis* (Lobosea: Gymnamoebia) Isolated from a Freshwater of Dokdo Island in the East Sea, Korea. *Animal systematics, evolution and diversity*, 32(1): 1-8.
- Pérez de Galindo MV, Galindo M, Dorta A, Guzmán de Rondón C, Wagner C, Vethencourt MA, Nessi A, Bermúdez A & Pérez de Suárez E. (2012). Hallazgos de Amibas de Vida Libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana. *Academia Digital Biomédica VITAE*, 51.
- Pereira L, Domínguez M, Ortiz N, Torres L, Placencio A & Bermúdez A. (2003). Clorhexidina y Polihexametil biguanida tópica para el manejo de queratitis por *Acanthamoeba*. *Revista Oftalmológica Venezolana*, 59 (4): 1-6.
- Petit F, Vilchez V, Torres G, Molina O, Dorfman S, Mora E, Cardozo J. (2006). Meningoencefalitis amebiana primaria. Comunicación de dos nuevos casos venezolanos. *Archivos de neuro-psiquiatria*, 64(4):1043-1046.
- Polat ZA, Obwaller A, Vural A & Walochnik J. (2012). Efficacy of miltefosine for topical treatment of *Acanthamoeba* keratitis in Syrian hamsters. *Parasitology Research*, 110(2): 515–522.
- Polat ZA, Walochnik J, Obwaller A, Vural A, Dursun A & Arici MK. (2014). Miltefosine and polyhexamethylene biguanide: a new drug combination for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 42(2): 151–158.
- Pussard M & Pons R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13:557–598.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	q1m4G8RK
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- 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. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60: 626-633.
- Qvarnstrom Y, Da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB & Visvesvara GS. (2009). Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal Infection Diseases*, 199: 1139–1142.
- Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R & da Silva A J (2006). Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10): 3589–3595.
- Real Academia Española, Diccionario de la Lengua Española, avance de la 23.º ed. (2016-a). Ameba. *Dle.rae.es*. Recuperado el 24 de Septiembre de 2016, de: <http://dle.rae.es/?id=2Ia7rRr>
- Real Academia Española, Diccionario de la Lengua Española, avance de la 23.º ed. (2016-b). Trofozoito. *Dle.rae.es*. Recuperado el 24 de Septiembre de 2016, de: <http://dle.rae.es/?id=2Ia7rRr>
- Real Decreto 664/1997 12 de Mayo: Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. *Boletín Oficial del Estado*, 124: 1-177. Recuperado el 11 de Marzo de 2017, de: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/agen_bio.pdf
- Reyes Batlle M, Wagner C, Zamora Herrera J, Vargas Mesa A, Sifaoui I, González AC, López Arencibia A, Valladares B, Martínez Carretero E, Piñero JE & Lorenzo Morales J (2016). “*Acanthamoeba* Genotypes T2, T4 and T11 in Soil Sources from El Hierro Island, Canary Islands, Spain”. *Parasitology Research*, 115(8): 2953-2956.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Researchgate.net*. (2017). Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de:
https://www.researchgate.net/figure/281486460_fig1.
- Roberts CW & Henriquez FL. (2010). Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of *Acanthamoeba* (species) infections. *Experimental Parasitology*, 126: 91–96.
- Rodríguez R, Méndez O, Molina O, Luzardo G, Martínez AJ, Visvesvara GS & Cardozo J. (1998). Central nervous system infection by free-living amebas: report of 3 Venezuelan cases. *Revista de Neurología*, 26(154): 1005-1008.
- Rodríguez-Zaragoza S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Critical reviews in Microbiology*, 20(3): 225-241.
- Sánchez A, Piña M, Revilla N, Pulgar A & Jurado L. (1991). Meningoencefalitis amibiana primaria: reporte de un caso. *Boletín Venezolano de Infectología*, 2(2): 53-54.
- Scheid P. (2015). Viruses in close associations with free-living amoebae. *Parasitology Research*, 114(11):3959-3967.
- Scheid P. (2016). A strange endocytobiont revealed as largest virus. *Current Opinion in Microbiology*, 1:58-62.
- Schmoller VH, Jonas, L. & Ludvik J. (1982). Electron microscopical studies on encystment of *Vahlkampfia trilaminata* n.sp. *Archiv für Protistenkunde*, 126: 427-444.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA & Byers TJ. (2001). Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5): 1903-1911.
- Schuster FL. (2002). Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (3): 342–354.
- Schuster FL & Visvesvara GS. (1996). Axenic growth and drug sensitivity studies of *Balamuthia mandrillaris*, an agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 385–388.
- Schuster FL & Visvesvara GS. (2004-a). Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*, 126: 91-120.
- Schuster FL & Visvesvara GS. (2004-b). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9): 1001-1027.
- Schuster FL & Visvesvara GS. (2004-c). Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*, 7: 41–51
- Schuster FL, Guglielmo BJ & Visvesvara GS. (2006-a). *In vitro* activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(2): 121-126.
- Schuster F L, Honarmand S, Visvesvara GS & Glaser CA. (2006-b). Detection of antibodies against free-living amoebae *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* species in a population of patients with encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 42(9): 1260–1265.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Schuster FL, De Jonckheere JF, Moura H, Sriram R, Garner MM & Visvesvara GS. (2003). Isolation of thermotolerant *Paravahlkampfia* sp. from lizard intestine: biology and molecular identification. *Journal of Eukaryotic, Microbiology* 50: 373–378.
- Schuster FL, Yagi S, Gavali S, Michelson D, Raghavan R, Blomquist I, Glastonbury C, Bollen AW, Scharnhorst D, Reed SL, Kuriyama S, Visvesvara GS, Glaser CA. (2009). Under the radar: *Balamuthia* amebic encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 48(7): 879-87.
- Scott-Foresman P. (2007). Amoeba_(PSF).png. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Ameba>.
- Seal DV. (2003). *Acanthamoeba* keratitis up-date incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* 17(8):893–905.
- Seas C & Bravo FG. (2006). Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuentemente en América Latina. *Revista Chilena de Infectología*, 23:197–199.
- Seidel JS, Harmatz P, Visvesvara GS, Cohen A, Edwards J & Turner J. (1982). Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 306: 346–348.
- Sharma R, Jhanji V, Satpathy G, Sharma N, Khokhar S & Agarwal T. (2013). Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. *Optometry and Vision Science Journal* 90(2): 53-55.
- Siddiqui R & Khan NA. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*, 5: 6.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Slater CA, Sickel JZ, Visvesvara GS, Pabico RC & Gaspari AA. (1994). Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *The New England Journal of Medicine*, 331: 85–87.
- Smirnov AV & Fenchel T. (1996). *Vahlkampfia anaerobica* n.sp. and *Vannella peregrina* n.sp. (Rhizopoda) - anaerobic amoebae from a marine sediment. *Archiv für Protistenkunde* 147: 189-198.
- Smirnov AV & Michel R (1999). New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (Lobosea, Gymnamoebia). *Protistology*, 1: 82-85.
- Smirnov AV, Chao E, Nassonova ES & Cavalier-Smith T. (2011). A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist*, 162: 545-570.
- Smirnov A, Nassonova E, Berney C, Fahrni J, Bolivar I & Pawlowski J. (2005). Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protistology* 156(2): 129-142.
- Solgi R, Niyiyati M, Haghghi A & Nazemalhosseini-Mojarad E. (2012). Occurrence of thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* spp. in Hot Springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 7: 47-52.
- 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. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(1): 45-54.
- Thomas V & Greub G. (2010). Amoeba/amoebal symbiont genetic transfers: lessons from giant virus neighbours. *Intervirology*, 53(5): 254-267.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Trabelsi H, Dendana F, Neji S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F & Ayadi A. (2016). Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitology Research*, 115(1): 431-5.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F & Ayadi A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie* (Paris), 60(6): 399-405.
- 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. *Parasitology Research*, 92(5): 405-413.
- Vahlkampfia*. (2017). *Bms.ed.ac.uk*. Recuperado el 14 de Febrero de 2017, de <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/vahlkampfia.htm>
- Valladares M, Reyes-Batlle M, Mora-Peces I, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorrín A, Comyn-Afonso E, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J. (2014). A multisystemic *Acanthamoeba* infection in a dog in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Veterinary Parasitology*, 205:707–711.
- Valladares M, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorrín A, Wagner C, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J. (2015). Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Archives of Microbiology*, 197(5):639-643.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- van der Beek NA, van Tienen C, de Haan JE, Roelfsema J, Wismans PJ, van Genderen PJ, Tanghe HL, Verdijk RM, Titulaer MJ, van Hellemond JJ. (2015). Fatal *Balamuthia mandrillaris* Meningoencephalitis in the Netherlands after Travel to The Gambia. *Emerging Infectious Diseases*, 21(5): 896-898.
- Villani E, Baudouin C, Efron N, Hamrah P, Kojima T, Patel SV, Pflugfelder SC, Zhivov A, Dogru M. (2014). In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Current Eye Research*, 39(3): 213–231.
- Venezuela. (2017). *Es.wikipedia.org*. Recuperado el 15 de Febrero de 2017 de <https://es.wikipedia.org/wiki/Venezuela>
- Visvesvara GS. (2010). Free-Living Amebae as Opportunistic Agents of Human Disease. *Journal of Neuroparasitology*, 1: 1-12.
- Visvesvara GS. (2013). Infections with free-living amoebae. *Handbook of Clinical Neurology*, 114: 153-68.
- Visvesvara GS, Moura H & Schuster FL. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 50(1): 1-26.
- Visvesvara GS, Schuster FL & Martínez AJ. (1993). *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *Journal of Eukaryotic of Microbiology* 40(4): 504–514.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Visvesvara GS, Martínez AJ, Schuster FL, Leitch GJ, Wallace SV, Sawyer TK & Anderson M. (1990). Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2750–2756.
- Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, Bandyopadhyay K, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Cabral GA. (2009). *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(4):357-366.
- Wagner C, Vethencourt M, Galindo M, Guzmán de Rondón C, Nessi A & Pérez de Galindo M.V. (2014). Diagnóstico de *Naegleria fowleri* mediante PCR en LCR de un lactante en el Laboratorio de Amibiasis. Trabajo presentado en las XXXIII Jornadas de la Sociedad Parasitológica Venezolana, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- Walia R, Montoya JG, Visvesvera GS, Booton GC & Doyle RL. (2007). A case of successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba* infection in a lung transplant recipient. *Transplant Infectious Diseases* 9(1): 51-54.
- Walochnik J, Duchêne M, Seifert K, Oberwaller A, Hottkowitz T, Wiedermann G, Eibl H & Aspöck H. (2002). Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 695–701.
- Walochnik J, Wylezich C & Michel R. (2010). The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Experimental Parasitology*, 126(1): 4-13.
- Webeye.ophth.uiowa.edu (2017). Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de: <http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/atlas/pages/acanthamoeba/index.html>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

- Webster D, Umar I, Kolyvas G, Bilbao J, Guiot MC, Duplisea K, Qvarnstrom Y & Visvesvara GS. (2012). Treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4): 715-718.
- Weekers PH, Gast RJ, Fuerst PA & Byers TJ. (1994). Sequence variations in small-subunit ribosomal RNAs of *Hartmannella vermiformis* and their phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 11(4): 684-690.
- Werth JM & Kahn AJ. (1967). Isolation and preliminary chemical analysis of the cyst wall of the amoeba-flagellate *Naegleria grüberi*. *Journal of Bacteriology*, 94(4):1272-4.
- Willaert, E. (1974). Primary amoebic meningo-encephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 54:429-440.
- Willaert E & Stevens AR. (1976). Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Pathologie et Biologie*, 24: 545-547.
- Wylezich C, Walochnik J & Michel R. (2009). High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations. *Parasitology Research* 105:869–873.
- Wylezich C, Walochnik J, Corsaro D, Michel R & Kudryavtsev A. (2015). Electron microscopical investigations of a new species of the genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* nov. sp., reveal a dictyosome for the first time in this genus. *Acta Protozoologica* 54:45–51.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Referencias bibliográficas

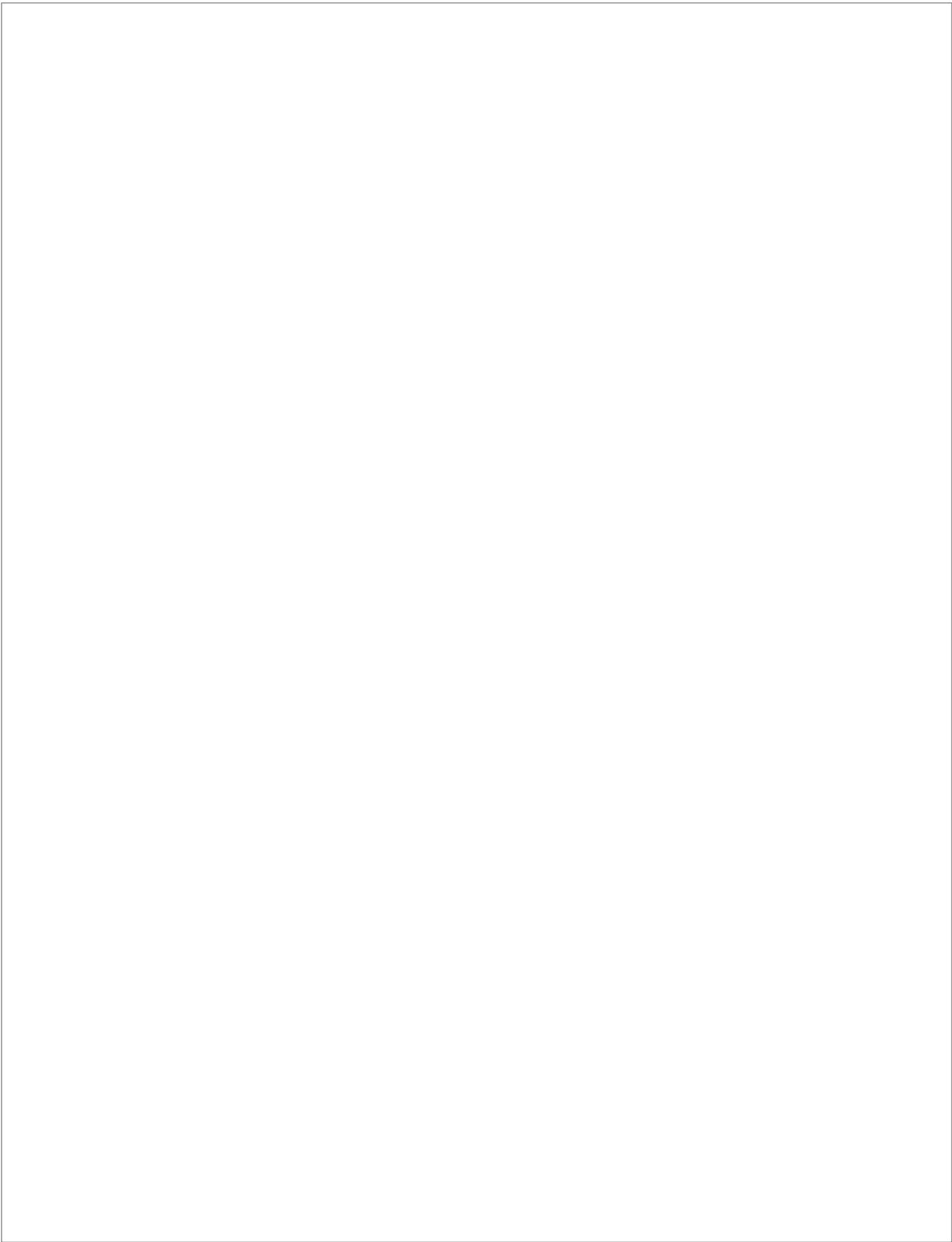
Yagi, S, Booton GC, Visvesvara GS & Schuster FL. (2005) Detection of *Balamuthia* mitochondrial 16S rRNA gene DNA in clinical specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 3192–3197.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

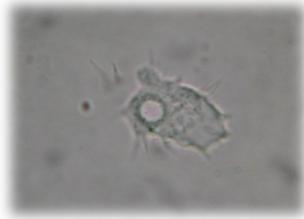


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	qlm4G8RK	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			01/06/2017 13:54:25



ANEXOS

“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable.”

Leonardo Da Vinci.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Isolation and molecular characterization of a *Naegleria* strain from a recreational water fountain in Tenerife, Canary Islands, Spain

María Reyes-Batlle^{1*}, Carolina Wagner^{1,2}, Atteneri López-Arencibia^{1,3}, Ines Sifaoui^{1,4}, Enrique Martínez-Carretero¹, Basilio Valladares¹, Jose E Piñero¹ and Jacob Lorenzo-Morales¹

¹University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain; ²Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela; ³Centre for Integrative Physiology, School of Biomedical Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK; ⁴Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

Abstract

Free-Living Amoebae (FLA) are widely distributed protozoa in the environment and have been isolated from many sources such as dust, soil and water. Among the pathogenic genera included in this group *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* and *Balamuthia mandrillaris* have been reported to be causative agents of lethal encephalitis, disseminated infections and keratitis. *Naegleria fowleri* is a pathogenic FLA species which causes Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM). At present there are not many available data on the distribution of *Naegleria* species in Spain from environmental sources. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of this genus in recreational water sources in the island of Tenerife, Canary Islands, Spain. In this study, ten samples collected from recreational water fountains were checked for the presence of *Naegleria* spp. using morphological and molecular identification tools. From the analysed samples, only one sample (seawater fountain) was positive for *Naegleria* spp. interestingly, not many reports of *Naegleria* spp. in seawater are available in the literature and thus awareness should be raised among the environmental and public health professionals.

Keywords

Amoeba, Meningoencephalitis, *Naegleria* spp., water, fountain

Introduction

Free living amoebae (FLA) are ubiquitous opportunistic pathogenic protozoa which have been isolated from many different environmental sources, mostly related to water and soil related environments (Schuster and Visvesvara 2004; Visvesvara *et al.* 2007; Lorenzo-Morales *et al.* 2013a, 2013b). At present, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, *Vahlkampfia* spp. and *Sappinia pedata* genera/species have been reported to produce pathologies in humans and other animals (Visvesvara *et al.* 2007; Qvarnstrom *et al.* 2009). More recently, the genus *Vermamoeba* has also been included in this group (Smirnov *et al.* 2011).

Naegleria genus includes 47 species, but only *N. fowleri* and *N. australiensis* have been reported to be pathogenic to humans and other animals (Visvesvara *et al.* 2007; Niyayati *et al.* 2010; Visvesvara *et al.* 2009; Marciano-Cabral *et al.* 2010). *Naegleria fowleri* has been isolated from different en-

vironments related to water, soil and air habitats (Rivera *et al.* 1987; De Jonckheere 2011). Given the opportunity and access to its host, *N. fowleri* produce fatal primary amoebic meningoencephalitis (PAM), which produces strong inflammation, normally manifesting as a hemorrhagic-necrotizing meningoencephalitis. The main symptoms include headache, stiff neck, fever, alteration of mental status, seizure and coma (Siddiqui *et al.* 2016). PAM consists in a strong inflammation, normally caused by neutrophils, eosinophils, macrophages and lymphocytes (Siddiqui *et al.* 2016). The incubation period between the exposition to the opportunistic parasite and the development of the disease varies from 1 to 16 days (Martínez 1977; Siddiqui *et al.* 2016). Pathogenic *N. fowleri* has been reported in all continents, except Antarctica (De Jonckheere 2011), although other species of *Naegleria* have been isolated from this region (Siddiqui *et al.* 2016). At the moment, only 250 cases of PAM have been reported worldwide, so it could be considered as a rare disease. Nevertheless, every year more

*Corresponding author: mreyesbatlle@gmail.com

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

cases are reported worldwide mostly in the American continent (Siddiqui *et al.* 2016). Even so, PAM presents a serious problem for public health because it is almost always a fatal infection, with only about 5% of patients surviving, affecting mainly immunocompetent children (De Jonckheere 2014).

Regarding the distribution of *Naegleria* species in Spain, two new species were reported in freshwater sources Tenerife, Canary Islands, Spain in 2006: *N. tenerifensis* and *N. canariensis* (De Jonckheere 2006). To the best of our knowledge no other reports on *Naegleria* or other FLA species excepting *Acanthamoeba* and *Vermamoeba* strains have been reported in environmental sources in Spain and the Canary Islands. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of *Naegleria* spp. and other FLA genera in recreational water sources from Tenerife, Canary Islands, Spain. Altogether, gathering further information on the distribution and potential to cause disease of FLA in the studied region.

Materials and Methods

Sample sites and culture of FLA

Ten water samples were collected from ten different recreational water fountains across the island of Tenerife (located in the Atlantic Ocean about 300 km off the northwestern coast of Africa and about 1,300 km from Europe; coordinates 28°28'06"N 16°15'17"W) using sterile 1 L glass bottles during the autumn season of 2015. Samples were kept at 4°C until further processing in the laboratory. Water samples were filtered using a vacuum manifold system and 0.45 µm nitrocellulose filters (Pall, Madrid, Spain). Filters were then cultured inverted onto 2% non-nutrient agar (NNA) plates with a layer of heat killed *E. coli* at room temperature and 37°C and were monitored daily for the presence of FLA as previously described using Page's key (Page, 1988; Lorenzo-Morales *et al.* 2005a, 2005b; Reyes-Batlle *et al.* 2015). Positive samples for FLA (morphologically identified under the inverted microscope) were cloned by dilution and transferred to the new culture plates for further molecular analyses as previously described (Lorenzo-Morales *et al.* 2006).

DNA extraction

DNA from cultures identified as positive for FLA by microscopy was extracted by placing 1–2 ml of amoebic cultures directly into the Maxwell® 16 tissue DNA purification kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). *Naegleria* ge-

netic DNA was purified using the Maxwell® 16 instrument as described in the Maxwell® 16 DNA purification kits technical manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

PCR and molecular characterization of isolates

After the DNA extraction, PCR amplification of the FLA 18S rDNA gene was carried out using a universal primer pair FLA-F and FLA-R (Smirnov *et al.* 2011). The resulting PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a MEGABACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Barcelona, Spain) in the University of La Laguna Sequencing Services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were aligned using Mega 5.0 software program (Tamura *et al.* 2011). The species identification was based on sequence homology analysis by comparison to the available FLA species 18S rDNA sequences in the Genbank database.

Results and Discussion

From the collected water samples, only one of them was positive for FLA (10%). Morphological analysis of the isolate was based on Page's key (Page, 1988) and allowed the identification of the strain as a member of *Naegleria* genus. A set of clones was prepared for further analysis and was rather uniform. Moreover, this isolate was able to transform to the flagellated stages and form cysts typical of *Naegleria* genus. Moreover, subtle morphological and size differences of trophozoites of clones of this strain were not permanent.

After that, molecular characterization of the strain was carried out by using PCR/sequencing of the 18S rDNA gene and confirmed the strain to be member of *Naegleria* species (more than 99% homology when compared to the available *Naegleria* spp. sequences in Genbank) (Table I). As shown in Table I, the *Naegleria* strains showing the highest homology to the one reported in this study were isolated from fish gills belonging to *Perca* and *Cyprinus* species (Dyková *et al.* 2006). Both fish species normally inhabit ponds which are characterized by the presence of standing water and a high content of debris and thus the *Naegleria* strains invading the fish gills are suspected to be capable of surviving these harsh conditions. Moreover, this environmental situation was very similar in the recreational water fountain which was positive for *Naegleria* spp. in our study.

Table I. *Naegleria* spp. sequences in Genbank [*Dyková *et al.* (2006), **data not published]

Strain/Clone	Host	GeneBank Nº	Homology
O3Z/I*	<i>Perca fluviatilis Linnaeus</i>	DQ768718.1	99%
K4482J**	<i>Cyprinus carpio</i>	JQ271703.1	99%

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Regarding the sample site positive for *Naegleria spp.* in this study, it is important to mention that it is a recreational fountain located in the capital of the island, Santa Cruz de Tenerife. Moreover, this fountain is an artificial lake containing seawater which is pumped from sea front and comes out as an artificial geyser in the middle of the fountain feature. Although swimming in this fountain is forbidden, local people and tourists often splash each other and put their feet inside during hot days. Moreover, *Naegleria fowleri* requires temperatures above 28°C to complete its life cycle (De Jonckheere 2014). Even though *N. fowleri* was not isolated in this study, a member of *Naegleria* genus was identified, suggesting that this environment could promote the proliferation of *N. fowleri*. In fact, the previous isolation of *Naegleria spp.* in Tenerife was reported from fresh water samples (De Jonckheere 2014), but in the current case the environmental source was sea water used in a recreational water fountain. To the best of our knowledge, this is the first time that *Naegleria* species are reported in recreational water sources in Tenerife Island. Finally, the obtained 18S rDNA sequence in this study revealed a 99 % homology to two previously determined isolates mentioned above, both from fish gills. Further molecular and phylogenetic analysis should be carried out but this now trio of strains appears to represent a new species of *Naegleria*.

Acknowledgments. This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain, the Project PI13/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III, and Project ref. AGUA3 "Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua" from Cajas Canarias Fundación. ALA was supported by a postdoctoral grant from the Fundación Canaria Manuel Morales, La Palma, Canary Islands. MRB was funded by the Project BIO24 (2016_25) "Principios activos inductores de apoptosis en la quimioterapia de tripanosomosis y leishmaniosis" from La Caixa Fundación. IS was funded by "Ayudas para estancias de estudiantes de posgrado e investigadores americanos y africanos – 2015" of the University of La Laguna. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RYC- 2011-08863.

References

- De Jonckheere J.F. 2014. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*. 145 Suppl: S2-9. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.07.011
- De Jonckheere J.F. 2006. Isolation and Molecular Identification of Vahlkampfiid Amoebae from an Island (Tenerife, Spain). *Acta Protozoologica*. 45, 91–96
- De Jonckheere J.F. 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*. 11, 1520–1528. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.07.023
- Dyková I., Pecková H., Fiala I., Dvořáková H. 2006. Fish-isolated *Naegleria* strains and their phylogeny inferred from ITS and SSU rDNA sequences. *Folia Parasitologica*. 53, 172–180
- Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Foronda P., Martínez E., Valladares B. 2005a. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*. 95, 273–277
- Lorenzo-Morales J., Monteverde-Miranda C.A., Jiménez C., Tejedor M.L., Valladares B., Ortega-Rivas A. 2005b. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 12, 233–236
- Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Martínez E., Khoubbane M., Artigas P., Periago M.V., Foronda P., Abreu-Acosta N., Valladares B., Mas-Coma S. 2006. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Tropica* 100, 63–9. DOI: 10.1016/j.actatropica.2006.09.008
- Lorenzo-Morales J., Cabello-Vilchez A.M., Martín-Navarro C.M., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Valladares B. 2013a. Is *Balamuthia mandrillaris* a public health concern worldwide? *Trends of Parasitology*. 29, 483–488. DOI: 10.1016/j.pt.2013.07.009
- Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Arnalich-Montiel A., Piñero J.E., Valladares B. 2013b. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology: Cell Press*. 29, 181–187. DOI: 10.1016/j.pt.2013.01.006
- Marciano-Cabral F., Jamerson M., Kaneshiro E. 2010. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of Water Health*. 8, 71–82. DOI: 10.2166/wh.2009.129
- Martínez A.J. 1977. Free-living amebic meningoencephalitis: comparative study. *Neurologia, Neurocirugía, Psiquiatría*. 18, 391–401
- Niyayati M., Lorenzo-Morales J., Rezaie S., Rahimi F., Martín-Navarro C.M., Mohebbi M., et al. 2010. First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype t3 and *Vahlkampfi* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Experimental Parasitology*. 126, 89–90. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.10.009
- Page F.C. 1988. A new key to fresh water and soil *Gymnamoebae*. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK*. pp.122
- Qvarnstrom Y., da Silva A.J., Schuster F.L., Gelman B.B., Visvesvara G.S. (2009). Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal of Infection Diseases*. 199, 1139–1142. DOI: 10.1086/597473
- Reyes-Battle M., Niyayati M., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Valladares B., Martínez-Carretero E., et al. 2015. Unusual *Vermamoeba vermiformis* strain isolated from Snow in Mount Teide, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Novelty in Biomedicine*, 3, 189–192
- Rivera F., Roy-Ocotla G., Rosas I., Ramirez E., Bonilla P., Lares F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environmental Research*. 42, 149–154
- Schuster F.L. and Visvesvara G.S. 2004b. Amoebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*. 126, 91–120. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.09.019
- Siddiqui R., Ali I.K., Cope J.R., Khan N.A. 2016. Biology and Pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Tropica*. 164, 375–394. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.09.009
- Smirnov A., Chao E., Nasonova E., Cavalier-Smith T. 2011. Revised classification of non-mycetozoa naked lobose amoebae (Amoebozoa). *Protist*. 162, 545–570. DOI: 10.1016/j.protis.2011.04.004
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maxi-

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

mum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731–2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121
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 Immunology Medicine Microbiology*. 50, 1–26. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x

Visvesvara G.S., Sriram R., Qvarnstrom Y., Bandyopadhyay K., Da Silva A.J., Pieniazek N.J., Cabral G.A. 2009. *Paravahlkampfia francinae* n. Sp. Masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56, 357–366. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2009.00410.x

Received: November 16, 2016

Revised: December 16, 2016

Accepted for publication: December 30, 2016

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Acanthamoeba genotypes T2, T4, and T11 in soil sources from El Hierro island, Canary Islands, Spain

María Reyes-Battle¹ · Jonadab Zamora-Herrera¹ · Alejandro Vargas-Mesa¹ · Marco Antonio Valerón-Tejera¹ · Carolina Wagner^{1,2} · Carmen Ma Martín-Navarro¹ · Atteneri López-Arencibia¹ · Ines Sifaoui^{1,3} · Enrique Martínez-Carretero¹ · Basilio Valladares¹ · José E. Piñero¹ · Jacob Lorenzo-Morales¹

Received: 10 March 2016 / Accepted: 7 April 2016 / Published online: 14 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The genus *Acanthamoeba* includes pathogenic strains which are causative agents of keratitis and encephalitis that often may end fatal in humans and other animals. In the present study, forty soil samples were collected in the island of El Hierro, Canary Islands, Spain, and checked for the presence of *Acanthamoeba*. Samples were cultivated onto 2 % non-nutrient agar plates seeded with a layer of heat killed *Escherichia coli*. Amplification by PCR and sequencing of the DF3 region of the 18S rDNA of *Acanthamoeba* was carried out in order to confirm morphological identification of the amoebae. Furthermore, *Acanthamoeba* spp. was isolated from 47.5 % of soil samples. Moreover, genotypes T2, T4, and T11 were identified in these samples. To the best of our knowledge, this is the first study to establish genotypes T2, T4, and T11 in soil sources from El Hierro island.

Keywords *Acanthamoeba* · El Hierro · Genotype · Canary Islands · Soil

✉ Jacob Lorenzo-Morales
JMLORENZ@ULL.EDU.ES

¹ University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

² Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

Introduction

Free-living amoebae belonging to the genus *Acanthamoeba* and the species *Naegleria fowleri* and *Balamuthia mandrillaris* are causative agents of lethal encephalitis and multisystemic infections as well as keratitis (in the case of *Acanthamoeba* genus) in humans and other animals (Siddiqui and Khan 2012; Lorenzo-Morales et al. 2013; Valladares et al. 2015).

Acanthamoeba strains are widely distributed in the environment worldwide and have been isolated from many habitats such as water, soil, dust, and many others (Lorenzo-Morales et al. 2015). To date, molecular classification of *Acanthamoeba* genus established 20 genotypes: T1–T20 that are based on the rRNA sequence of the isolates (Booton et al. 2005; Qvamstrom et al. 2013; Magnet et al. 2014; Nuprasert et al. 2010; Corsaro et al. 2015). Of the 20 genotypes, T4 is the most abundant in the environment and includes many pathogenic strains that have been associated with neurological and eye diseases (Lorenzo-Morales et al. 2013). Until the present stage, there are no available studies in the island of El Hierro focused on the identification of *Acanthamoeba* strains in soil sources and are scarce in the Canary Islands. Therefore, the developed study aimed to check for the presence of *Acanthamoeba* in soil sources collected in the island of El Hierro, Tenerife, Canary Islands, Spain.

Material and methods

Sampling area and soil sample collection

The selected area for this study was the island of El Hierro (Canary Islands, Spain (27° 45' N 18° 00' W)). El Hierro is the

 Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

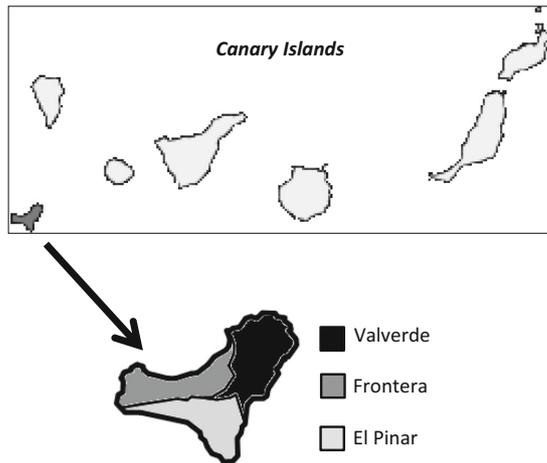


Fig. 1 Map of El Hierro Island, Canary Islands, Spain

smallest and farthest south and west of the Canary Islands in the Atlantic Ocean off the coast of Africa, with a population of around 10,000 inhabitants. Moreover, the island was designated by UNESCO as a Biosphere Reserve in 2000 (Fig. 1).

Forty soil samples were collected in this region using 15-ml sterile tubes. Approximately 1 g of each soil sample was inoculated onto 2 % non-nutrient agar (NNA) plates also seeded with heat killed *Escherichia coli*, incubated at room temperature, and checked daily for the presence of *Acanthamoeba* for up to a month.

DNA extraction and PCR amplification assay

DNA was extracted by gently scraping amoebae from ANN plates using 1–2 ml of sterile Neff's saline and after that, placed directly into the Maxwell® 16 Tissue DNA purification kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell® 16 Instrument as described in the Maxwell® 16 DNA purification kits technical manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain) as previously described (Todd et al. 2015). DNA amplification reactions were performed using genus-specific markers for *Acanthamoeba*. A volume of 30 µl containing approximately 40 ng template DNA, buffer (1×) without MgCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2.5 pmol of each primer pair, and 1.25 units of Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, New Jersey), pH 8.3, was used for amplification in a Artik Cycler thermocycler (Thermo Scientific). The cycling conditions were as follows: initial denaturation of 95 °C for 5 min; 40 repetitions of denaturation at 95 °C for 45 s, annealing phase at 50 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 45 s; and final elongation at 72 °C for 7 min. Amplification products were fractionated using 2 % agarose electrophoresis stained with a solution of 20.000× of REALSAFE nucleic acid staining solution (Durviz, Madrid, Spain) and visualized under the UV light. *Acanthamoeba castellanii* Neff American Type Culture Collection

Table 1 Strains and genotypes isolated from soil sources in El Hierro island

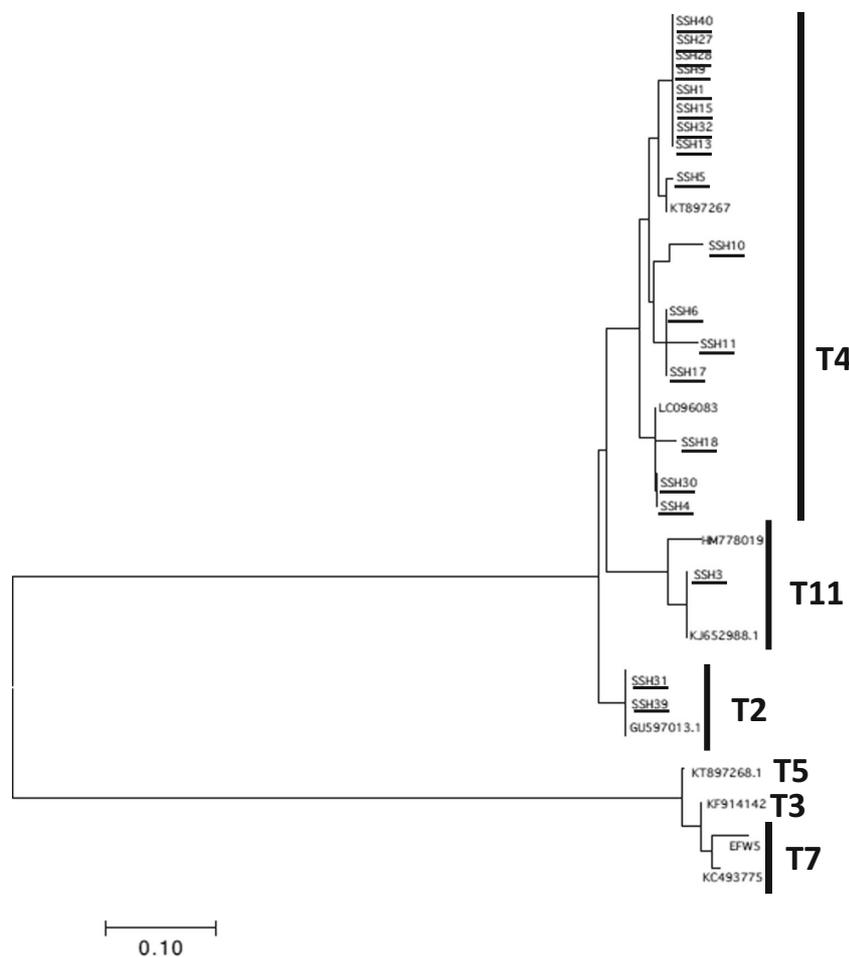
Strain	Sampling area	Locality	NNA	PCR	Species	Genotype	Genebank #
SSH1	Charco Manso	Valverde	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885362
SSH3	Tacorón	El Pinar	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T11	KU885363
SSH4	Binto	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885364
SSH5	Los Bascos	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885365
SSH6	Garóe	Valverde	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885366
SSH9	Jinama	Valverde	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885367
SSH10	El Sabinar	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885368
SSH11	La Laja	El Pinar	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885369
SSH13	Mirador de las Playas	El Pinar	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885370
SSH15	La Restinga	El Pinar	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885371
SSH17	Poblado Guinea	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885372
SSH18	Mirador de Bascos	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885373
SSH27	Tiñor	Valverde	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885374
SSH28	La Restinga	El Pinar	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885375
SSH30	Charco de Los Sargos	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885376
SSH31	Te Esperaré	Valverde	+		<i>Acanthamoeba</i>	T2	KU885377
SSH32	El Juaclo	El Pinar	+		<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885378
SSH39	Mirador de Bascos	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T2	KU885379
SSH40	La Maceta	Frontera	+	+	<i>Acanthamoeba</i>	T4	KU885380

(ATCC) 30010 strain was used as a positive control and distilled water added to the reaction mixture (instead of DNA) as the negative control.

Sequencing and genotyping of strains

PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany), according to the manufacturer's instructions, and sequenced in both directions. The sequencing was done in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Spain) using the University of La Laguna sequencing services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were edited and aligned using Mega 5.0 software program (Tamura et al. 2011). Phylogenetic analyses were carried out using the methodology described by Reyes-Batlle et al. (2014), with Mega 5.0 software program.

Fig. 2 18S rDNA DF3 linearized neighbor-joining tree obtained by MEGA 5.0 for genotypes of *Acanthamoeba* soil isolates from El Hierro island. The type sequences were taken from GenBank and are presented under the following numbers: *Acanthamoeba* genotype T4 isolate KK3 Accession #KT897267; *Acanthamoeba* genotype T4 strain isolate 84 Accession #LC09083; *Acanthamoeba* genotype T11 isolate AK Accession #KJ652988; *Acanthamoeba palestinensis* T2 genotype isolate A9/FB1 Accession #GU597013; *Acanthamoeba* genotype T5 isolate MS1 Accession #KT897268; *Acanthamoeba griffini* strain genotype 19779 Mexico Accession #KF914142; *Acanthamoeba astronyxis* strain PSHCW4 genotype T7 Accession #KC493775; *Acanthamoeba* sp. EFW5 genotype T7 Accession #DQ992178



The sequences for the new isolates are deposited in the Genbank database under the accession numbers KU885362–KU885380 (Table 1).

Results and discussion

In this study, a 47.5 % (19) of the collected soil samples were positive for *Acanthamoeba* spp. Moreover, phylogenetic analysis after sequencing of the DF3 region of the 18S rDNA gene indicated that 19 *Acanthamoeba* isolates obtained from these soil sources belonged to the T2 (2), T4 (16), and T11 (1) genotypes (Fig. 2).

Acanthamoeba genotype T4 is the genotype most often associated with human infection (Booton et al. 2005; Lorenzo-Morales et al. 2015) but it is also the most commonly isolated genotype from the environment. However, a statistical analysis shows that the frequency of T4 association with

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

human disease is not explained by its frequency in the environment alone (Maciver et al. 2013) and so in humans at least, T4 is specifically pathogenic. Previous work from our group has shown that potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains are present in a variety of sources in the Canary Islands including soil sources (Lorenzo-Morales et al. 2005, 2007; Reyes-Batlle et al. 2014). The obtained data specifically for soil sources in the Canary Islands have detected the presence of *Acanthamoeba* strains in 40 and 62.5 % of the soil samples studied in the islands of Tenerife and Gran Canaria, respectively. Moreover, the most prevalent genotype was T4 (Lorenzo-Morales et al. 2005; Reyes-Batlle et al. 2014). In other regions, T4 has also been reported to be the most common genotype, and occurrence of *Acanthamoeba* strains has varied from 26.6 % in a dry region of Iran (Rahdar et al. 2012) to 63.9 % in Jamaica (Todd et al. 2015). Furthermore, Geisen et al. (2014) supported the data mentioned above and obtained in this study, since they stated that genotype T4 was highly abundant in soil samples collected from many countries and regions worldwide (Geisen et al. 2014). Therefore, the high occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 found in the samples collected in this study is not surprising. Nevertheless, further studies should be developed in order to establish the pathogenic potential of the isolated strains, and also, awareness should be raised among clinicians and public health workers in this region.

Acknowledgments This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the program of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain; the Project PI13/00490 “Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados” from the Instituto de Salud Carlos III; and Project ref. AGUA3 “Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua” from CajaCanarias Fundación. ALA and MRB were funded by Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación Cajacanarias para Postgraduados 2014. IS was funded by Ayudas para estancias investigadores—ULL, 2015. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RYC-2011-08863. Authors are grateful to Jorge Rodríguez for his help during the sampling in the island of El Hierro.

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* 43:1689–1693
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB (2015) *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res* 114(7):2481–2490
- Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M (2014) *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitol Res* 113(9):3151–3158
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B (2005) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res* 95(4):273–277
- Lorenzo-Morales J, López-Darías M, Martínez-Carretero E, Valladares B (2007) Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. *Exp Parasitol* 117(1):74–79
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Amalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B (2013) *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol* 29(4):181–187
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J (2015) An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22:10
- 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
- Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C (2014) Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res* 113:2845–2850
- Nuprasert W, Putapomtip 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* 48:4636–4640
- 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* 60:626–633
- Rahdar M, Niyayati M, Salehi M, Feghhi M, Makvand M, Pourmehdi M, 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
- Reyes-Batlle M, Todd CD, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Cabello-Vilchez AM, González AC, Córdoba-Linús E, Lindo JF, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2014) Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res* 113(4):1383–1388
- Siddiqui R, Khan NA (2012) Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 5:6
- 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* 28:2731–2739
- Todd CD, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, Dorta-Gorrín A, López-Arencibia A, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lindo JF, Lorenzo-Morales J (2015) Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from soil sources from Jamaica, West Indies. *J Eukaryot Microbiol* 62(3):416–421
- Valladares M, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorrín A, Wagner C, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J (2015) Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Arch Microbiol* 197(5):639–643

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Isolation and Molecular Identification of *Vermamoeba vermiformis* Strains from Soil Sources in El Hierro Island, Canary Islands, Spain

María Reyes-Battle¹ · Carolina Wagner^{1,2} · Jonadab Zamora-Herrera¹ · Alejandro Vargas-Mesa¹ · Ines Sifaoui^{1,3} · Ana C. González¹ · Atteneri López-Arencibia¹ · Basilio Valladares¹ · Enrique Martínez-Carretero¹ · José E. Piñero¹ · Jacob Lorenzo-Morales¹

Received: 8 February 2016 / Accepted: 25 February 2016 / Published online: 7 April 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Free-living amoebae (FLA) are widely distributed protozoa in the environment and have been isolated from many sources such as dust, soil and water. Furthermore, some genera/species of FLA such as *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* spp. are also able to cause opportunistic infections in humans and other animals. More recently, FLA have been reported to be environmental carriers of pathogenic bacteria, fungi and viruses, and thus have gained further importance from the public health point of view. Among them, *Acanthamoeba* spp. and *Vermamoeba vermiformis* have been described in many occasions as the most common carriers of pathogens of high medical relevance such as *Legionella pneumophila* and *Mycobacterium* spp. In this study, 24 soil samples were collected from the island of El Hierro, Canary Islands, Spain, in order to check for the presence of *V. vermiformis* strains in these samples. Soil samples were cultured on 2 % non-nutrient agar plates covered with a thin layer of heat-killed *E. coli* and checked daily for the presence of *Vermamoeba*. After a week, *V. vermiformis* amoebae were observed in 5 of the 24 processed samples (20.8 %) incubated at room temperature and 37 °C. Molecular characterization was carried out by amplifying the 18S rDNA gene and DNA sequencing,

confirming that the isolated strains belonged to *Vermamoeba vermiformis* species. The high percentage of *V. vermiformis* in the studied soil sources should raise awareness in the region since these amoebae are potential environmental carriers of pathogens of high medical relevance.

Introduction

Some members of free-living amoebae (FLA) are able to act not only as opportunistic pathogens but also as vehicles of other pathogens such as bacteria and viruses [8, 16]. Regarding the prevalence in water bodies, FLA of *Acanthamoeba* and *Vermamoeba* genus are among the most common genera/species described in the literature [3–5, 11]. The FLA species, *Vermamoeba vermiformis* seems to be a very common amoebic species worldwide. Moreover, it has recently gained medical relevance since it is an environmental carrier of highly important pathogenic agents such as *Legionella pneumophila* [2, 15, 16]. Furthermore, this amoebic species presents a wide distribution and has been described from many habitats including geothermal springs and even snow [1, 9, 13]. Even though *V. vermiformis* seems to be common in water sources, there is a general lack of studies that determine the presence of these amoebae in soil-related sources, which forms the basis for the aim of our study.

In this study, 24 soil samples from the island of El Hierro were collected and checked for the presence of *V. vermiformis*. The isolated amoebae were identified using both morphological and PCR/sequencing tools. To the best of our knowledge, this is the first report of *V. vermiformis* species from soil sources in the island of El Hierro and in the Canary Islands.

✉ Jacob Lorenzo-Morales
jmlorenz@ull.edu.es

¹ University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

² Cátedra de Parasitología, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

 Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Materials and Methods

Sample Collection and Location

Soil samples were collected from the island of El Hierro, Canary Islands, Spain (27°45'N 18°00'W; Fig. 1) using sterile 15 ml tubes during the summer season of 2015. Samples were kept at room temperature until further processing in the laboratory. The island of El Hierro, nicknamed *Isla del Meridiano* (the Meridian Island), is the smallest and farthest south and west of the Canary Islands in the Atlantic Ocean off the coast of Africa, with a population of around 10,000 inhabitants. Moreover, the island was designated by UNESCO as a Biosphere Reserve in 2000.

Culture and Identification of the Amoebae

Approximately 1 g of each soil sample was inoculated onto 2 % non-nutrient agar (NNA) plates with a layer of heat-killed *E. coli* at room temperature and 37 °C as previously described [10]. Later, the plates were monitored daily for

the presence of *Vermamoeba vermiformis* as previously described [9, 10]. Plates that were suspected to carry amoebae were subcultured until a plate free of contaminant organisms was obtained. Unfortunately, axenification of the strains for further cellular analyses was not successful even in 2 % Bactocasitone.

DNA Isolation and Molecular Identification by PCR

DNA from cultures identified as positive for FLA by microscopy was extracted as previously described [9, 10] by placing 1–2 ml of amoebae cultures directly into the Maxwell[®] 16 Tissue DNA Purification Kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell[®] 16 Instrument as described in the Maxwell[®] 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop[®] 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

Later, PCR amplification of the FLA 18S rDNA gene was carried out using a universal primer pair FLA-F and FLA-R [12]. The resulting PCR products were purified

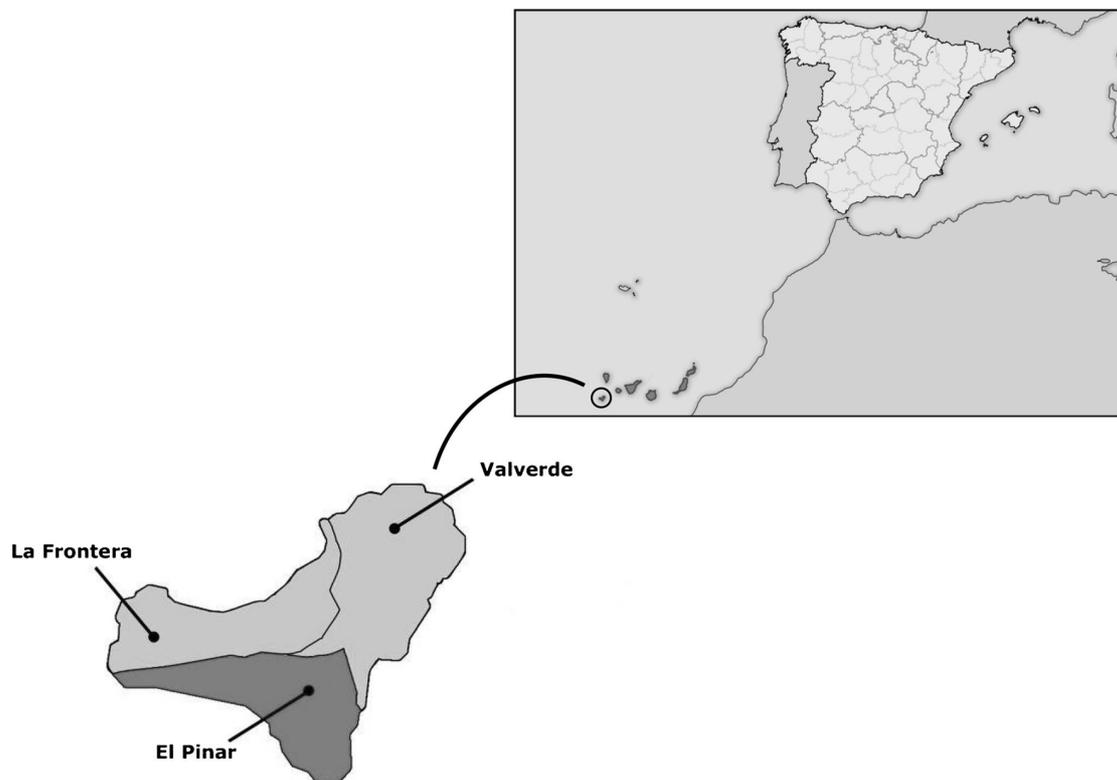


Fig. 1 The island of El Hierro showing the three localities included in this study

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

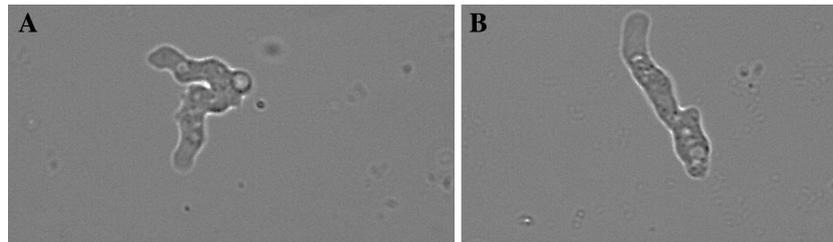
Table 1 Strain codes and localities of the *V. vermiformis* isolates in El Hierro, Canary Islands, Spain

Code	Sampling area	Locality	NNA	PCR	Species	Accession # ^a	Homology ^b (%)
SSH12	Cruz de Los Reyes	Frontera	+	+	<i>V. vermiformis</i>	KU746978	99
SSH13	Mirador de Las Playas	El Pinar	+	+	<i>V. vermiformis</i>	KU746977	99
SSH16	Mirador de La Peña	Valverde	+	+	<i>V. vermiformis</i>	KU746979	99
SSH19	Faro de Orchilla	El Pinar	+	+	<i>V. vermiformis</i>	KU746980	99
SSH23	Valverde Town Centre	Valverde	+	+	<i>V. vermiformis</i>	KU746981	99

^a Accession number of the new *V. vermiformis* isolates

^b Homology % with other *V. vermiformis* sequences available in Genbank such as KP792388.1, KT185625.1, KC161965

Fig. 2 *Vermamoeba vermiformis* trophozoites (T) at $\times 100$ of magnification isolated in the island of El Hierro strain: **a** SSH13 Strain. **b** SSH16 Strain



using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a MEGABACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Barcelona, Spain) in the University of La Laguna Sequencing Services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were aligned using Mega 5.0 software program [14]. Species identification was based on sequence homology analysis by comparing the available *Vermamoeba vermiformis* DNA sequences in the Genbank database.

Results and Discussion

Morphological characterization of amoebic strains using the currently available identification key from Page [7] yielded the identification of five (20.8 %) *V. vermiformis* strains from the 24 soil samples included in this study (Table 1; Fig. 2). Later, molecular characterization of the strains was carried out using PCR/sequencing of the 18S rDNA gene and confirmed all strains to be members of *V. vermiformis* species (99 % homology when compared to the available *Vermamoeba vermiformis* sequences in Genbank: KP792388.1, KT185625, KC161965, and 97 % homology to a keratitis-related isolate from Tenerife EF205324).

Interestingly, positive samples in this study corresponded to regions widely visited by tourists and locals (SSH12, SSH13, SSH16 and SSH19 strains) and also the

capital of the island, Valverde (SSH23) (Table 1). Regarding the sampling sites that were positive for *Vermamoeba vermiformis*, it is important to mention that strains SSH13 and SSH16 were isolated from touristic viewpoints, among which Mirador de La Peña is one of the landmarks visited by most of the locals and tourists yearly, which can even get crowded in some times of the year. Both viewpoints are located around 650 m above the sea level. In the case of strain SSH12, it was isolated from a widely visited landmark by locals, and it is related to religious celebrations (Cruz de Los Reyes) and thus many people could get in contact with the amoebae in this area. The Faro de Orchilla (Orchilla lighthouse) hosted strain SSH19. This landmark on the South-West of El Hierro island represents a significant location in terms of the Canary Islands, as it is one of the most westerly points in the islands. A meridian memorial close to the Faro de Orchilla is a reminder that historically this area was considered to be a prime meridian for early map makers, and was known as the Ferro Meridian, at the western extremity of the known world. Again, due to its historical importance, it is widely visited by many locals and tourists. Finally, the strain SSH23 was isolated from a garden at the entrance of the capital of the island, Valverde which hosts the highest number of inhabitants on the island. Interestingly, all the positive sampling sites in this study were related to some of the more crowded regions on this otherwise quiet island.

The presence of this species in soil samples in the island should raise awareness to health authorities since this

amoebic species acts as a carrier of pathogens of high medical relevance. To the best of our knowledge, this is the first report of *Vermamoeba vermiformis* from soil sources in the island of El Hierro and in the Canary Islands, although we have isolated this species from the eye of an amoebic keratitis patient from Tenerife [17] and from the snows of Mount Teide [9].

Acknowledgments This work was supported by the Grants RICET (Project No. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain, the Project PI13/00490 “Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados” from the Instituto de Salud Carlos III, and Project ref. AGUA3 “Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua” from CajaCanarias Fundación. ALA and MRB were funded by “Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación Cajacanarias para Postgraduados 2014”. IS was funded by “Ayudas para estancias de estudiantes de posgrado e investigadores americanos y africanos – 2015” of the University of La Laguna. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RIC-2011-08863.

References

- Bonilla-Lemus P, Caballero Villegas AS, Carmona Jiménez J, Lugo Vázquez A (2014) Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp Parasitol* 145(Suppl.):S28–S33
- Fouque E, Trouilhé MC, Thomas V, Humeau P, Héchar Y (2014) Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: effects of environmental conditions and cell concentration. *Exp Parasitol* 145(Suppl.):S62–S68
- Fouque E, Yefimova M, Trouilhé MC, Quellard N, Fernandez B, Rodier MH, Thomas V, Humeau P, Héchar Y (2015) Morphological study of the encystment and excystment of *Vermamoeba vermiformis* revealed original traits. *J Eukaryot Microbiol* 62(3):327–337
- Lorenzo-Morales J, Coronado-Álvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, 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, Khan NA, Walochnik J (2015) An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22:10
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B (2005) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res* 95(4):273–277
- Page EC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Cumbria*
- Pagnier I, Valles C, Raoult D, La Scola B (2015) Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb Pathog* 80:14–20
- Reyes-Batlle M, Niyiyati M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Valladares B, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2015) Unusual *Vermamoeba vermiformis* Strain Isolated from Snow in Mount Teide, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Novel Biomed* 3(4):189–192
- Reyes-Batlle M, Todd CD, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Cabello-Vílchez AM, González AC, Córdoba-Lanús E, Lindo JF, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2014) Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res* 113(4):1383–1388
- Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu Kwaik Y (2013) Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence* 4(4):307–314
- Smirnov AV, Chao E, Nassonova ES, Cavalier-Smith T (2011) A revised classification of the naked lobose amoebae (*Amoebozoa: lobosa*). *Protist* 162:545–570
- Solgi R, Niyiyati M, Haghighi A, Mojarad EN (2012) Occurrence of thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* Spp. in hot springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iran J Parasitol* 7(2):47–52
- 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* 28:2731–2739
- Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G (2008) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 10:2728–2745
- Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY (2010) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 34:231–259
- Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B (2007) Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res* 102:167–169

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Artículos

- [Identificación de aislados de *Acanthamoeba* spp mantenidos en el laboratorio de amibiasis-UCV, mediante PCR-RFLP](#)
- [Introducción](#)
- [Materiales y Métodos](#)
- [Resultados](#)
- [Discusión](#)
- [Referencias](#)

Mónica Galindo
galindomonica@yahoo.com
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Maria Alejandra Vethencourt
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Anaibeth Nessi
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Carlos Conde
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Victoria Luongo
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Raibeth Machado
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Alejandra Uqarte
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Maria Virginia Pérez de Galindo
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Carolina Wagner
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Carmen Guzmán de Rondón
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Parasitología**Identificación de aislados de *Acanthamoeba* spp mantenidos en el laboratorio de amibiasis-UCV, mediante PCR-RFLP**

Fecha de recepción: 20/10/2015
Fecha de aceptación: 19/02/2016

Dentro del género *Acanthamoeba* existen especies relacionadas con patologías presentes en los humanos. Su identificación y clasificación se realizaba por morfología, pero es subjetiva y de baja sensibilidad y especificidad. Por ésto, es importante incorporar herramientas de biología molecular. El objetivo de esta investigación fue caracterizar molecular y morfológicamente 24 aislados de *Acanthamoeba*, mantenidos en el Laboratorio de Amibiasis-Escuela de Bioanálisis-UCV, mediante PCR-RFLP (*HinfI*, *HhaI* y *HaeIII*), previamente identificados morfológicamente como *Acanthamoeba* (Pussard y Pons 1977). Ningún aislado perteneció al grupo I. De los 24 aislados, 45,8% presentó características morfológicas compatibles con el grupo II, 45,8% con el grupo III y 8,4% con ambos grupos. Molecularmente, 50% de los aislados amplificaron productos de 900 pb y 50% de 700 pb. Los aislados del grupo III, no se pudieron caracterizar molecularmente por PCR-RFLP, ya que el patrón de digestión no coincidió con patrones previamente publicados. Solo se identificó el 33% de los aislados resultando: *A. polyphaga* (A9, A12, A13, A14), *A. castellanii* (A26, A27, A28 y A29) y *A. castellanii* o *A. polyphaga* (A15, A25 y A30). Las especies identificadas coinciden con las patógenas más comúnmente descritas en la literatura.

Palabras Claves: Amibas de vida libre; *Acanthamoeba* spp; PCR-RFLP.

Title

Identification of *Acanthamoeba* spp. isolates maintained at the amibiasis laboratory of Universidad Central de Venezuela, USING PCR-RFLP

Abstract

Acanthamoeba genus includes some species related to pathology in humans. Their identification and classification was made by morphology, but it is a subjective technique and has low sensitivity and specificity. For these reasons, it is important to incorporate molecular tools. The objective of this research was to characterize morphologic and molecular features of 24 *Acanthamoeba* isolates, maintained at Laboratorio de Amibiasis-Escuela de Bioanálisis-UCV, previously identified as *Acanthamoeba*, using light microscopy and morphological criteria according to Pussard and Pons, 1977 and PCR-RFLP (*HinfI*, *HhaI* and *HaeIII*) respectively. Morphologically, none of the strains belonged to group I. 45.8% of all isolates presented compatible morphology with Group II, other 45.8% with group III and 8.4% with both groups. Molecularly, 50% of the isolates amplified a 900 pb product and the other 50%, a 700 pb product. Isolates of Group III could not be molecularly characterized by PCR-RFLP, since the digestion pattern have no coincidence with previous reports. Only 33% of strains were finally identified: *A. polyphaga* (A9, A12, A13, A14), *A. castellanii* (A26, A27, A28 and A29) and *A. castellanii* or *A. polyphaga* (A15, A25 and A30). The identified species are consistent with the most common pathogens described at the literature. Key words: Free living amoebae; *Acanthamoeba* spp; PCR-RFLP.

Key Word

Free living amoebae; *Acanthamoeba* spp; PCR-RFLP

Introducción

Las Amibas de Vida Libre (AVL) son protozoarios que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza⁽¹⁾. Algunas especies se han encontrado causando enfermedades del sistema nervioso central, así como úlceras corneales⁽²⁾ y conjuntivitis⁽³⁾. Hasta ahora se han reportado como agentes causales de enfermedad en humanos: *Naegleria fowleri*, varias especies del

http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=5254&rv=122

1/8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

género *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* (2,4), *Sappinia pedata* (5), de la cual sólo se ha reportado un caso, un caso de Meningoencefalitis producida por *Paravahlkampfia francinae* (6) y un caso de keratitis atípica en un paciente con herpes, del cual se aisló *Paravahlkampfia* sp. (6)

Las AVL del género *Acanthamoeba*, son las que producen mayor número de casos de afecciones en el hombre y se han descrito varias especies que pueden producir principalmente tres patologías: Encefalitis Granulomatosa Amibiana (EGA), queratitis Acanthamebiana (QA) y Dermatitis Acanthamebiana (DA). De éstas, la QA es la manifestación clínica más frecuente, principalmente en personas inmunocompetentes usuarios de lentes de contacto (7), reportándose que 1 de cada 1500 usuarios de lentes de contacto, en el transcurso de 30 años de uso, pueden desarrollar úlcera corneal. Actualmente, se reconoce el incremento de las úlceras corneales producidas por amibas del género *Acanthamoeba*, en diferentes partes del mundo (8).

El diagnóstico de las AVL como agente causal de patologías en el humano no es fácil. Sin embargo, la identificación morfológica a partir de cultivos, a pesar de su gran utilidad, carece de rapidez y su sensibilidad es limitada para realizar el diagnóstico oportuno (9).

Dentro del género *Acanthamoeba* se han descrito varias especies y subespecies. Las especies que se han aislado a partir de muestras biológicas con mayor frecuencia son: *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis*. Inicialmente, éstas se clasificaban basándose en los criterios establecidos por Pussard y Pons 1977 (10), quienes propusieron la existencia de tres grupos, basándose en el tamaño y la morfología de los quistes. En el grupo I se incluían las especies que presentaban quistes grandes (> 18µm), ectoquiste liso y redondeado y claramente separado del endoquiste, con un aspecto estrellado. En el grupo II y III se ubicaban las especies cuyos quistes eran menores de 18 µm. El ectoquiste de las especies del grupo II presenta un aspecto arrugado y el endoquiste estrellado, poligonal o triangular; mientras que a los quistes del grupo III se les describe un ectoquiste liso y un endoquiste redondeado o ligeramente angular, con poca separación entre ambos. Esta clasificación entre especies es difícil y poco específica, sobre todo entre el grupo II y III, cuyos quistes a veces no son fácilmente diferenciables (10).

En la actualidad, el empleo de técnicas moleculares, ha permitido que la clasificación y el diagnóstico de estas amibas sean mucho más rápidos, sensibles y específicos.

Diversas técnicas moleculares se han empleado para la clasificación de aislados de *Acanthamoeba*. El RFLP o Polimorfismo de la longitud de los fragmentos obtenidos por enzimas de restricción, en conjunto con la PCR, se utilizan para detectar e identificar estos parásitos (11,12). Con el objeto de realizar la genotipificación de aislados de *Acanthamoeba*, se ha empleado la caracterización del gen RNAr 18S cuyo polimorfismo ha permitido identificar 17 genotipos (T1-T20). Se ha observado que las especies relacionadas con la producción de úlceras corneales se encuentran en los grupos T2-T6 y T11-T15, siendo el genotipo mas fuerte el T4, el cual se relaciona con el grupo II de acuerdo a la clasificación morfológica. (12-16)

En Venezuela, hasta ahora, no había sido posible establecer las especies de *Acanthamoeba* más frecuentes, lo cual ha limitado la evaluación clínica del paciente en relación a la susceptibilidad, pronóstico y tratamiento.

Por las razones anteriormente expuestas, se evaluó el gen de la subunidad ribosomal 18S de 24 aislados de *Acanthamoeba* spp, obtenidos de muestras de personas, tanto sintomáticas como asintomáticas y de lentes de contacto, mantenidos en el Laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis de la UCV.

Materiales y Métodos

Se analizaron 24 aislados provenientes de diversas muestras biológicas (úlceras corneales, hisopado conjuntival, exudado conjuntival, lentes de contacto, heces y aspirado de absceso cerebral). Previamente se habían identificado según su morfología como *Acanthamoeba* spp, y se mantuvieron en cultivo en medio de Chinchilla modificado (9), desde su aislamiento hasta la fecha. La nomenclatura empleada para su identificación fue acordada por los miembros de este laboratorio, empleando la letra "A" precediendo a un número asignado. Los aislados fueron: A1, A2, A3, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A25, A26, A27, A28, A29, A30, A31.

Clasificación Morfológica

Se realizó la clasificación en grupos, siguiendo los criterios propuestos por Pussard y Pons (10).

Caracterización Molecular (PCR-RFLP)

El ADN fue extraído de trofozoítos y quistes obtenidos de medio de cultivo monoxénico de Chinchilla modificado, incubado a 37°C por 72 horas. Los trofozoítos y quistes colectados, se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4, y fueron ajustados a una concentración determinada, mediante recuento en Cámara de Neubauer. Posteriormente, fueron resuspendidos en 300 µL de tampón de lisis, se almacenó durante 24 horas a 0°C y el ADN se extrajo con minicolumna, según instrucción del fabricante (Wizard®, Promega, USA).

La pureza y concentración del ADN se determinó midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm;

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

además se determinó la relación 230/260 nm y 260/280 nm.

Se realizó la amplificación por PCR de una región del gen que codifica la Subunidad Ribosomal menor 18S (ARNr SU 18S), empleando los iniciadores descritos previamente por Kong y Chung⁽¹⁷⁾, *Acantha-for* (5' TTTGAATTCGCTCCAATAGCGTATATTA3') y *Acantha-rev* (5' TTTGAATTCAGAAAAGAGCTATCAATCTGT 3'), los cuales dan origen a amplificadas entre 910-930 pb.

La mezcla de PCR se realizó a un volumen final de 50 µL, con las siguientes concentraciones finales: 1X del tampón de PCR; 0,2 mM de los dinucleótidos (dNTPs); 3,0 mM de MgCl₂; 0,5 µM de cada *primer* y 1 unidad de *Taq* Platinum (Promega®, USA). La amplificación de la PCR se realizó a 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 60 segundos y 72 °C por 1,5 minutos. Una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos y una fase de polimerización final de 10 minutos a 72 °C. Los amplificados se corrieron en gel de agarosa al 2% en tampón TBE, junto con un marcador de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen®, USA) y revelado con SYBR safe (Invitrogen®, USA). Las concentraciones de los reactivos para realizar la PCR y las condiciones de amplificación, fueron estandarizadas previamente en el Laboratorio de Ambiasis-UCV (datos no publicados).

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción (RFLP) *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III (Promega®, USA), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Los geles fueron fotografiados con un trasluminador de LUV y comparados los perfiles electroforéticos de bandas, con los descritos por Kong y Chung, 1996⁽¹⁷⁾.

Para obtener el tamaño de los fragmentos de restricción, se midió la distancia recorrida por cada una de los fragmentos del marcador de Pb y se relacionó con el tamaño en pb en un sistema de coordenadas semilogarítmico. De esta forma, se obtuvo una recta la cual se utilizó para extrapolar los fragmentos obtenidos de los aislados, luego del RFLP.

Análisis estadístico

El análisis estadístico que se utilizó en esta investigación fue de tipo no paramétrico debido al tamaño de la muestra. Dependiendo de las comparaciones a realizar se empleó la prueba de Mann-Whitney U o Prueba exacta de Fischer, utilizando el software SPSS versión 18. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Caracterización morfológica de los quistes

Los aislados A2, A12, A13, A14, A15, A25, A27, A28, A29, A30 y A31 fueron incluidos en el grupo II, por presentar quistes con el ectoquiste plegado. Los aislados A1, A3, A10, A11, A16, A17, A18, A19, A20, A21 y A22 se incluyeron dentro del grupo III, ya que presentaban quistes con el ectoquiste liso. Los quistes de los aislados A9 y A26 presentaron morfologías compatibles tanto con grupo II y grupo III, observándose el 60% de los quistes con superficie plegada. El diámetro de los quistes pertenecientes al grupo II fue en promedio 11,85 µm (Rango: 9,6-14,0 µm), significativamente más grande ($p = 0,035$, una cola) que los del grupo III, los cuales medían en promedio 9,5 µm (Rango: 7,8-10,85 µm).

También se tomó en cuenta el número de puntas del endoquiste y la cantidad de éstas que hacen contacto con el ectoquiste. Los aislados del grupo III presentaban muy pocas o ninguna punta en el endoquiste, por lo tanto no existe contacto con la pared, a diferencia de los aislados clasificados en el grupo II, en los que se observa el endoquiste poligonal o estrellado, con 1 a 5 puntas que contactan con el ectoquiste. La diferencia del valor promedio de las puntas que contactan es estadísticamente significativo entre ambos grupos ($p = 0,005$). (Fig.- 1)

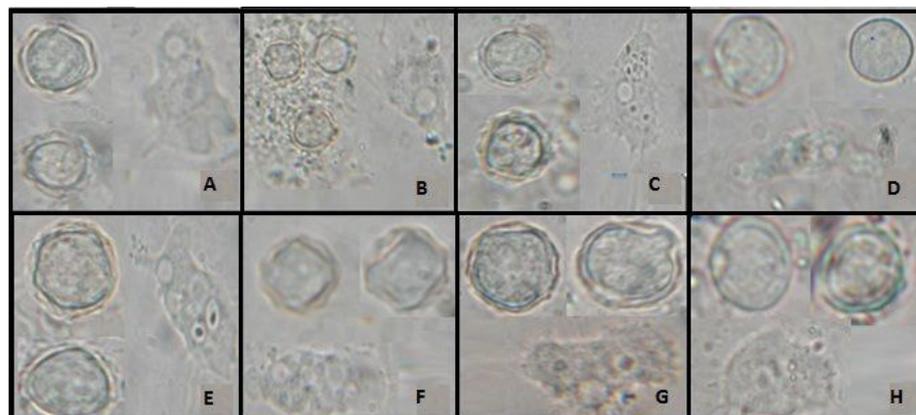


Figura 1.- Trofozoítos y quistes de algunos aislados de *Acanthamoeba* spp pertenecientes al grupo II y III según Pussard y Pons. Examen directo de cultivo en medio Chinchilla modificado. Objetivo 100x. A: quistes y trofozoítos de A2 B: quistes y trofozoítos de A13 C: quistes y trofozoítos de A14 D: quistes y trofozoítos de A16 E: quistes y trofozoítos de A15 F: quistes y trofozoítos de A29 G: quistes y trofozoítos de A30 H: quistes y trofozoítos de A21

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Caracterización morfológica de los trofozoitos

Para la caracterización morfológica de los trofozoitos de *Acanthamoeba* spp. se tomó en cuenta el diámetro mayor y menor de los trofozoitos, número de vacuolas contráctiles, diámetro de las vacuolas contráctiles, pseudópodos emitidos y número de acantopodios. En términos generales, los trofozoitos clasificados dentro del grupo II fueron estadísticamente más grandes, tanto en longitud mayor (LM) ($21,7 \pm 6,3 \mu\text{m}$), como en longitud menor (Lm) ($11,6 \pm 3,75 \mu\text{m}$) que aquellos que se ubicaron en el grupo III (LM $18,67 \pm 8,28 \mu\text{m}$; Lm $10,28 \pm 4,27 \mu\text{m}$). Se observó diferencias significativas en el número de pseudópodos emitidos siendo mayor para los trofozoitos del grupo III ($p=0,04$). El tiempo de mantenimiento en el Laboratorio de los aislados del grupo III, fue significativamente mayor que el de los aislados ubicados en el grupo II ($p=0,020$). (Fig.-1)

Clasificación molecular

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Producto de la amplificación del ADN, se obtienen fragmentos de 900 pb para los aislados A9, A12, A13, A14, A15, A25, A26, A27, A28, A29, A30 y A31 y de 700 pb para los aislados A1, A3, A10, A11, A16, A17, A18, A19, A20, A21 y A22, lo cual se corresponde con la existencia de los grupos morfológicos II y III, respectivamente. Únicamente el aislado A2 clasificado dentro del grupo II presentó un producto de 700 pb (Fig.- 2)



Figura 2.-Productos de PCR de surRNA18 de aislados de *Acanthamoeba* spp. pertenecientes al grupo II y grupo III según los criterios morfológicos. PB: Marcador de 100 pares de bases; M: Mezcla; pb: pares de bases producto de RFLP

Al evaluar la relación entre el tiempo de mantenimiento en cultivo y el tamaño del producto del PCR obtenido de los aislados de *Acanthamoeba* spp., se observó que los aislados con más de 10 años de mantenimiento en cultivo presentaban productos de 700 pb, mientras que aquellos que tenían un tiempo de mantenimiento menor a 10 años, presentaban un producto de 900 pb ($p=0,007$).

RFLP

Una vez realizada la digestión de los productos de PCR con las enzimas *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III, solo se pudo identificar el 33% de los aislados estudiados. Los aislados pertenecientes al grupo III con productos de PCR de 700 pb, no pudieron ser identificados, por no poder compararse con los patrones de digestión publicados por Kong y Chung⁽¹⁷⁾.

La caracterización molecular aplicada (PCR-RFLP) permitió determinar las especies de los aislados A9, A12, A13, A14 como *A. polyphaga* y la especie de los aislados A26, A27, A28 y A29 como *A. castellanii*. (Fig.- 3)

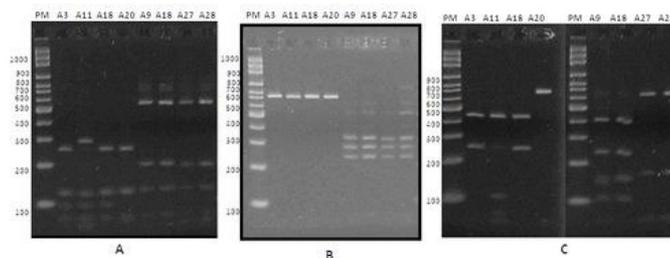


Figura 3. Perfil de digestión del gen de la subunidad ribosomal 18S de los aislados A3, A11, A18, A20, A9, A18, A27, A28 de *Acanthamoeba* spp. En el Gel A se observa la digestión realizada con *Hinf* I En el Gel B se observa la digestión realizada con *Hha* I En el Gel C se observa la digestión realizada con *Hae* III Electroforesis en gel de Agarosa al 2,5%, teñido con SYBER safe (Invitrogen®, USA). PB: Marcador de 100 pares de bases; M: Mezcla; pb: pares de bases producto del RFLP. C1: control 1- *A. castellanii* C2: control 2- *A. polyphaga*.

Los aislados A15, A25 y A30, se identificaron como *A. castellanii* o *A. polyphaga*, quedando pendiente su determinación a través de otras metodologías moleculares.

En lo que respecta a A31, no se obtuvo digestión con las enzimas seleccionadas, ya que el producto amplificado por PCR no tuvo un rendimiento adecuado aunque se intentó concentrar el ADN o realizar una reamplificación de productos anteriores, visualizándose una débil banda de 900 pb luego de la electroforesis en gel de agarosa al

2,5%.

En la Tabla 1 se puede observar los aislados, producto de PCR e identificación a nivel de especie y relación con el tiempo que han permanecido en cultivo.

3	Procedencia	Año
A1	Úlcera corneal	1988
A2	Exudado nasal	1991
A3	Úlcera corneal	1991
A9	Hisopado conjuntival	1992
A10	Heces-diarrea	1993
A11	Úlcera corneal	1993
A12	Úlcera corneal	1994
A13	Heces	1994
A14	Heces	1994
A15	Lentes de contacto y úlcera corneal	1995
A16	Lentes de contacto y úlcera corneal	1996
A17	Lentes de contacto y úlcera corneal	1995
A18	Exudado conjuntival	1996
A19	Úlcera corneal	1996
A20	Exudado conjuntival	1997
A21	Exudado conjuntival	1995
A22	Úlcera corneal	1997
A25	Úlcera corneal	2001
A26	Úlcera corneal	2001
A27	Úlcera corneal	2001
A28	Lente de concato	2002
A29	Lentes de contacto	2003
A30	Aspirado de Absceso cerebral	2004
A31	Úlcera corneal	2007

En lo que se refiere a los resultados de la digestión de los productos de PCR de 700 pb pertenecientes al grupo III, no se observó correspondencia entre los productos de digestión con las enzimas *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III y los patrones publicados por Kong y Chung 1996^(17,18). Sin embargo, se pudo observar una similitud en los perfiles de digestión obtenidos luego de la acción de la enzima *Hinf* I, para los aislados A16, A17 y A10. Adicionalmente, entre estos últimos y los aislados A19 y A21, hubo una similitud entre 50% y 75% de los perfiles de digestión.

Discusión

Las amibas de vida libre (AVL) son conocidas como amibas anfitrónicas, debido a la capacidad que tienen de existir como organismos de vida libre en la naturaleza, como ocasionalmente invadir un hospedero y vivir como parásito. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, por lo que los humanos estamos en frecuente contacto con estas ellas^(1,19).

Las AVL se reconocen como parásitos emergentes, y se justifica su búsqueda, por el creciente número de usuarios de lentes de contacto y de personas inmunosuprimidas, así como las dificultades de diagnóstico y tratamiento⁽¹⁹⁾. Aunado a esto, la creciente invasión humana de nuevos espacios perturbando los ecosistemas, que pueden afectar, la cantidad, la especie de microorganismos y sus nutrientes, lo que da la posibilidad de establecerse, colonizar y convertirse en patógenas para el hombre⁽²⁰⁾. En consecuencia, todos éstos hechos nos obligan a continuar nuestros trabajos en el Laboratorio de Amibiasis y al perfeccionamiento de los métodos para evidenciarlos tempranamente.

Las amibas del género *Acanthamoeba* son las más frecuentes, incrementándose la prevalencia de la QA en las últimas décadas, con el aumento del uso de lentes de contacto⁽²¹⁾. Sin embargo, hay entidades patológicas de menor prevalencia que la QA pero de alto índice de mortalidad, debido al rápido progreso y gravedad de la enfermedad, como la EGA Y DA⁽²²⁾.

En Venezuela, no había sido posible establecer la identificación de especies de aislados considerados como *Acanthamoeba* spp., bien por la forma heterogénea de presentación morfológica del protozoario o por no contar con la tecnología, herramientas, información o recursos necesarios para llevar a cabo tal objetivo. En la actualidad, el único centro de referencia para el estudio de las amibas de vida libre es el Laboratorio de Amibiasis de la UCV, donde se hace el diagnóstico de género por morfología y métodos de cultivo, aunque ya se han

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

implementado las metodologías basadas en Biología Molecular, siendo pioneros en este tipo de estudios y resaltando la importancia del conocimiento de estos protozoarios en la epidemiología de nuestro país.

Para esta investigación se analizaron 24 aislados de *Acanthamoeba*, a los cuales se les realizó un análisis morfológico y molecular con la finalidad de establecer la especie de cada uno de ellos. El análisis morfológico se hace de rutina en nuestro laboratorio ya que con la identificación hasta género, es posible instaurar un tratamiento ⁽⁴⁾. Kong HH, 2009, señala que la observación de los cultivos sigue siendo el método más usado y que deben usarse varios métodos simultáneos, para el hallazgo de *Acanthamoeba*, en la misma muestra ⁽¹¹⁾ y otros autores consideran que aún se mantienen los criterios morfológicos de Pussard y Pons 1977 para la identificación morfológica. ⁽⁹⁾

Ninguno de los aislados se ubicó dentro del grupo I según Pussard y Pons ⁽¹⁰⁾, ya que todos los quistes median menos de 18µm. La cantidad de puntas donde el ectoquiste hace contacto con el endoquiste y el aspecto del ectoquiste, permitió ubicar a los aislados dentro de los grupos II y III. Al relacionar la morfología de los quistes, con el tamaño de los productos de PCR obtenidos, se observó que existe concordancia entre la presencia de quistes lisos (grupo III) con un producto de 700 pb y la presencia de quistes festoneados o plegados (Grupo II), con la amplificación de un producto de 900 pb ($p=0,005$).

Los aislados A1, A3, A10, A11, A16, A17, A18, A19, A20, A21 Y A22 se ubicaron en el grupo III, además comparten entre sí, la cualidad de que sus productos amplificados por PCR fueron de 700 pb; un tamaño en pb inferior al esperado de 900 pb, según Kong y Chung 1996 ⁽¹⁷⁾. El otro grupo, correspondiente a los aislados A2, A9, A12, A13, A14, A15, A25, A26, A27, A28, A29, A30 y A31, mostraron características morfológicas distintas al grupo anterior: quistes con ectoquiste liso o plegado (en su mayoría plegados), significativamente con más puntas y trofozoítos relativamente más grandes, así como productos de amplificación por PCR para género de 900 pb. Tal heterogeneidad fue inesperada en los resultados a nivel molecular, ya que se escogió en la literatura los cebadores utilizados por Kong y Chung ⁽¹⁷⁾, debido a que para el género se podría esperar una pequeña variación entre 910 y 930 pb, para la mayoría de las especies de *Acanthamoeba*, excepto *A. astronixys*, en la cual se podría obtener un producto amplificado de 1170 pb.

Es posible que los resultados obtenidos para los aislados del grupo III, se deban a una alteración de la región altamente conservada que pudo haber modificado las características fenotípicas de estos aislados. Estadísticamente, se pudo observar una tendencia a obtener productos de PCR de 700 pb, en aislados mantenidos en cultivo más 10 años.

Una de las principales ventajas de realizar un estudio basado en el análisis del gen que codifica para la sub-unidad ribosomal, es que, al ser una estructura molecular que posee gran estabilidad con el paso del tiempo, presenta cambios estructurales pequeños e independientemente de éstos, es posible la identificación de especies, incluso aquellas estrechamente relacionadas. Sin embargo, numerosos estudios han comprobado que la porción analizada en este estudio (18S) poseen áreas de ADN no codificantes o intrones que pueden alterar la estructura genética, modificar el tamaño de los amplificados por PCR y por lo tanto afectar la correcta interpretación del mismo ^(17,18). Esto claramente, constituye un problema a la hora de comparar con los patrones de referencia y procurar la identificación de las especies.

Un factor posiblemente determinante en este estudio es la antigüedad de los aislados, pues estos protozoarios tienen la capacidad de cambiar sus características morfológicas y metabólicas de acuerdo al tiempo, temperatura de mantenimiento y las condiciones de cultivo ⁽¹⁹⁾.

La identificación de las especies mediante RFLP se logró en un 33% del total de los aislados seleccionados mantenidos en el Laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis. Las especies identificadas fueron *A. castellani* para A26, A27, A28 y A29, *polyphaga* para A9, A12, A13 y A14 y se obtuvo patrones solapados, para A15, A25 y A30 impidiendo su identificación definitiva, siendo compatible con los patrones de *A. castellani* y *A. polyphaga*. Por otra parte, estos resultados se corresponden muy bien con las especies agrupadas por Pussard y Pons ⁽¹⁰⁾, que indican que las posibles especies para el género *Acanthamoeba* que exhibían características morfológicas compatibles con miembros del grupo II pueden ser *A. castellani* y/o *A. polyphaga*.

La clasificación de Pussard y Pons ⁽¹⁰⁾, además de diferenciar los quistes, logra agrupar ciertas especies, de modo que las que se encuentran en el grupo II comprenden un amplio grupo entre las que se hallan *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba castellanii*, y son en conjunto con las del grupo III, los patógenos más comúnmente aislados de muestras clínicas a nivel mundial ⁽²²⁾.

El 50% de los aislados seleccionados para este proyecto, no presentó productos de digestión similares a los patrones de digestión con cada una de las enzimas publicadas por Kong y Chung 1996 ⁽¹⁷⁾. Sin embargo, algunos de los aislados con productos de PCR de 700 pb, generaron patrones de digestión semejantes entre sí con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Hae* III, aun cuando esto no permitió su clasificación.

En el caso de A31, a pesar de que se obtuvo un producto de PCR de 900 pb, el rendimiento de RFLP no logró ajustarse tras varios intentos, habiendo esto impedido la posibilidad de la identificación.

Como se demuestra en este estudio, si bien no es posible determinar las especies de

http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=5254&rv=122

6/8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Acanthamoeba, sólo por el estudio microscópico, existen diferencias estructurales que avalan la clasificación de 1977, en grupos morfológicos y dichos grupos además presentan diferencias genéticas importantes, lo cual facilita la diferenciación y en último término la identificación y genotipificación de los mismos.

A futuro, en el Laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis de la UCV, el estudio del genotipo, mediante la secuenciación del gen codificante del ARNr 18S de los aislados mantenidos, esclarecerá si éstos se corresponden con los genotipos más virulentos. Este hecho constituye un pilar relevante de la presente investigación, pues propone la posibilidad, de establecer un protocolo clínico que permita la instauración de la terapia adecuada en cada caso por el médico tratante, tal como lo sugiere Sissons y cols.,⁽²³⁾ quienes establecen, que se requiere realizar pruebas moleculares para saber si la amiba encontrada pertenece a una especie patógena conocida y así conocer el riesgo para el paciente, sobre todo para usuarios de lentes de contacto.

Referencias

- 1.- Visvesvara, G.S. & Stehr-Green, J.K. Epidemiology of free-living ameba infections. *J Protozool* 1990; 37: 25-33.
- 2.- Schuster, F.L., & Visvesvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1001-1027.
- 3.-Bermúdez A, Pérez de Galindo MV, Martínez Y, Pérez de Suárez E, Nieto T. Identificación de *Acanthamoeba* sp en tres pacientes con conjuntivitis. *An Inst Barraquer (BARC)* 1998; 27: 157-63.
- 4.-Visvesvara GS & Maguire JH. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Trop Infect Dis* 2006; 2:1114-25.
- 5.-Qvamstron Y, Da Silva AJ, Schusters FL, Gelman BB, Vivesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent o amoebae encephalitis. *J Infect Dis* 2009; 199: 1139-42.
- 6.-Ozkoc S, Tuncay S, Delibas SB, Akisu C, Osbek Z, Durak I, Walochnic J. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 y *Paravahlkampfia* sp from two clinical samples. *J Med Microbiol* 2008; 57(pt 3): 392-6.
- 7.- Oddó, B.D. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Rev Chil Infect* 2006; 23: 200-14.
- 8.- Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens* 2007; 33: 1-8.
- 9.- Pérez de G MV, Galindo MV, Dorta A, Guzmán de R CT, Wagner C, Vethencourt MV, Nessi A, Bermúdez A, Pérez de S E. Hallazgos de Amibas de Vida libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana. *VITAE* 51, Julio-Septiembre 2012. Disponible: http://vitae.ucv.ve/index_Pdf.php?module=articulo_pdf&n=4718&rv=1
- 10.- Pussard, M. y Pons, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistologica* 1977; 13: 557-98.
- 11.- Kong HH. Molecular Phylogenic *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 2009; 47:21-28.
- 12.- Lass A, Szostakowska B, Idzinska A. The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated natural water reservoirs in Poland. *Parasitol Res* 2014; 113: 2693-9.
- 13.-Kong H H. Molecular Phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 2009; 47: S21-S28.
- 14.-Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awward MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J eukaryote Microbiol* 1998; 45:45-54.
- 15.- Booton, C.G., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelley, D.J., & Fuerst, P.A. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1689-93.
- 16.- Koshler, M., Leitner, B., Blaschitz, M., Michel, R., Aspöck, H. & Walochnik, J. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). *Parasitol Res* 2006; 98: 86-93.
- 17.- Kong H.H. y Chung D.I. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. *Korean J Parasitol* 1996; 34: 127-34.
- 18.- Kong H.H. y Chung D.I. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and 18S Small-Subunit Ribosomal DNA PCR-RFLP Analyses of *Acanthamoeba* Isolated from Contact Lens Storage Cases of Residents in Southwestern Korea. *J Clin Microbiol* 2002;

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

40: 1119-206.

19.-Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp as agent of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 273-307.

20.- Marcogliese D. Parasites of superorganism: Are they indicators of ecosystem health?. Int J Parasitol 2005; 35:705-16.

21.- Lorenzo-Morales J, Khan N, Walochnick J. An update on Acanthamoeba keratitis: pathogenesis and treatment. Parasite 2015; 22: 10.

22.- Schuster, F.L. y Visvesvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004; 34: 1001-27.

23.- Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Khan NA. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. Microbial Pathogenesis 2004; 37: 231-39.

NOTA: Toda la información que se brinda en este artículo es de carácter investigativo y con fines académicos y de actualización para estudiantes y profesionales de la salud. En ningún caso es de carácter general ni sustituye el asesoramiento de un médico. Ante cualquier duda que pueda tener sobre su estado de salud, consulte con su médico o especialista.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

RESEARCH NOTE

Isolation of thermotolerant *Vermamoeba vermiformis* strains from water sources in Lanzarote Island, Canary Islands, Spain

María Reyes-Batlle¹, Carolina Wagner^{1,2}, Jonadab Zamora-Herrera¹, Alejandro Vargas-Mesa¹, Ines Sifaoui^{1,3}, Ana C. González¹, Atteneri López-Arencia¹, Basilio Valladares¹, Enrique Martínez-Carretero¹, José E. Piñero¹ and Jacob Lorenzo-Morales^{1*}

¹University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain; ²Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela; ³Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

Abstract

In this study, twenty water samples were collected in the island of Lanzarote, Canary Islands, Spain in order to check for the presence of *V. vermiformis* strains in these samples. Water samples were cultured on 2% Non-Nutrient Agar (NNA) plates covered with a thin layer of heat killed *E. coli* and checked daily for the presence of *Vermamoeba*. After a week, *V. vermiformis* amoebae were observed in 2 of the 20 processed samples (10%) incubated at room temperature and 37°C. Molecular characterization was carried out by amplifying the 18S rDNA gene and DNA sequencing in order to confirm the identity of the isolated amoebic strains. To the best of our knowledge, this is the first report on the presence of FLA in environmental sources in Lanzarote Island and the first report of *Vermamoeba vermiformis* in water sources in this island. Furthermore, the two strains isolated in this study were collected in recreational areas with close contact with humans and thus awareness should be raised.

Keywords

Vermamoeba vermiformis; water; Lanzarote; Canary Islands; Spain

Free-Living Amoebae (FLA) are widely distributed microorganisms worldwide which are able to act as opportunistic pathogens and also as vehicles of other pathogens such including bacteria and viruses (Lasjerdi *et al.* 2015; Thomas *et al.* 2010; Pagnier *et al.* 2015). Regarding the prevalence in water bodies, FLA of *Acanthamoeba* and *Vermamoeba* genera are among the most common genera/species described in the literature (Adamska *et al.* 2014; Fouque *et al.* 2015; Lorenzo-Morales *et al.* 2015; Richards *et al.* 2010). Furthermore, *Vermamoeba vermiformis* has recently gained medical relevance as it has been described to be an environmental vector of *Legionella pneumophila* and other clinical relevant bacteria (Adamska *et al.* 2014; Fouque *et al.* 2014; Thomas *et al.* 2008, 2010). This amoebic species presents a wide distribution

in the environment mostly in water sources. Moreover, it is able to grow at a wide range of temperature and has even been isolated from thermal water bodies and snow (Bonilla-Lemus *et al.* 2014; Reyes-Batlle *et al.* 2015; Thomas *et al.* 2008). Even though *V. vermiformis* seems to be common in water sources, no previous studies have been carried out in the island of Lanzarote and hence the aim of the present research.

In this study, twenty water samples were collected in the the island of Lanzarote and checked for the presence of *V. vermiformis*. The isolated amoebae were identified using both morphological and PCR/sequencing tools. To the best of our knowledge, this is the first report of FLA and also *V. vermiformis* species from water sources in the island of Lanzarote.

*Corresponding author: jmlorenz@ull.edu.es

- 10.1515/ap-2016-0088

Downloaded from De Gruyter Online at 09/18/2016 06:13:20PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

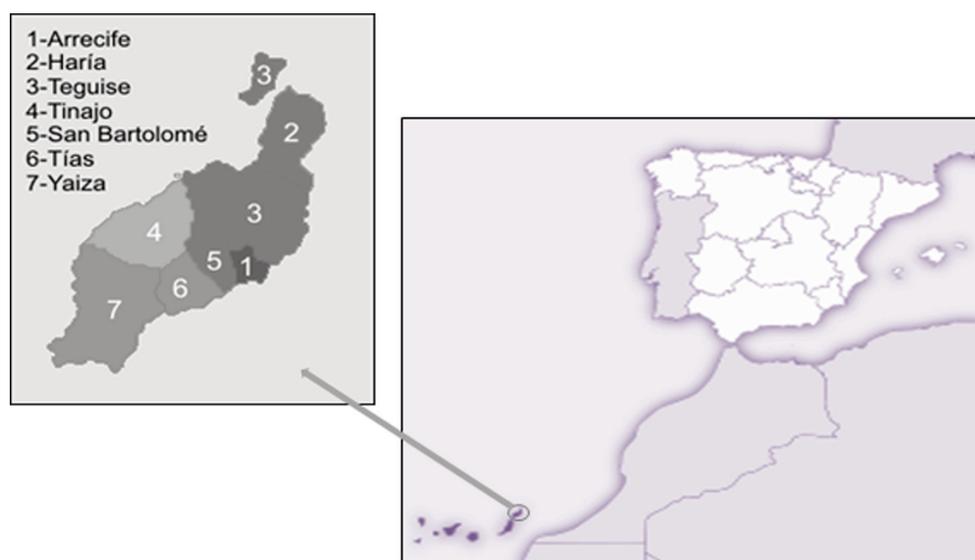


Fig. 1. The island of Lanzarote showing the two sampling points which were positive for *V. vermiformis* in this study

Water samples were collected from the island of Lanzarote, Canary Islands, Spain (29° 2' 6" N, 13° 37' 58.8" W) (Fig. 1) using sterile 1 L glass bottles tubes during the summer season of 2015. Samples were kept at 4°C until further processing in the laboratory. The island of Lanzarote is the easternmost of the Ca-

nary Islands, in the Atlantic Ocean, approximately 125 km (78 mi) off the coast of Africa. Moreover, Lanzarote is the fourth largest of the islands and presents a population of around 141.938 inhabitants, making Lanzarote the third most populated island of the Canary Islands, after Tenerife and Gran Canaria.

Table I. Strain codes and localities of the *V. vermiformis* isolates in Lanzarote, Canary Islands, Spain

Code	Sampling area	Locality	Source	NNA	PCR	Species	Homology
WSL1	Charco de San Ginés	Arrecife	Beach	-	-	-	
WSL2	Castillo San Gabriel	Arrecife	Beach	-	-	-	
WSL3	Haría Village	Haría	Tap	-	-	-	
WSL4	Ye	Arrecife	Tap	-	-	-	
WSL5	Arrecife Town	Arrecife	Fountain	-	-	-	
WSL6	Hotel	Arrecife	Beach	-	-	-	
WSL7	Airport	Arrecife	Tap	-	-	-	
WSL8	Harbour	Arrecife	Beach	-	-	-	
WSL9	Puerto del Carmen	Tías	Beach	-	-	-	
WSL10	Puerto del Carmen	Tías	Tap	-	-	-	
WSL11	Teguise Town	Tías	Tap	-	-	-	
WSL12	Teguise Town	Tías	Fountain	-	-	-	
WSL13	Costa Teguise	Teguise	Jacuzzi	+	+	<i>V. vermiformis</i>	99%
WSL14	Costa Teguise	Teguise	Tap	-	-	-	
WSL15	Mirador del Río	Arrecife	Spring	-	-	-	
WSL16	Mirador del Río	Arrecife	Fountain	-	-	-	
WSL17	Mirador del Río	Arrecife	Tap	-	-	-	
WSL18	Punta Mujeres	Haría	Tap	-	-	-	
WSL19	Punta Mujeres	Haría	Beach	-	-	-	
WSL20	Yaiza	Yaiza	Fountain	+	+	<i>V. vermiformis</i>	99%

- 10.1515/ap-2016-0088
Downloaded from De Gruyter Online at 09/18/2016 06:13:20PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Water samples were filtered using a vacuum manifold system and 0.45 µm nitrocellulose filters (Pall, Madrid, Spain). Filters were then cultured inverted onto 2% non-nutrient agar (NNA) plates with a layer of heat killed *E. coli* at room temperature and 37°C and were monitored daily for the presence of FLA as previously described (Lorenzo-Morales *et al.* 2005 a, b; Reyes-Batlle *et al.* 2015). Plates that were suspicious for amoebae were subcultured until a clean plate was obtained. Unfortunately, axenification of the strains for further cellular analyses was not successful even using 2% Bactocasitone.

DNA from cultures identified as positive for FLA by microscopy was extracted as previously described (Reyes-Batlle *et al.* 2014, 2015) by placing 1–2 ml of amoebae cultures directly into the Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell® 16 Instrument as described in the Maxwell® 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain). After that, PCR amplification of the FLA 18S rDNA gene was carried out using a universal primer pair FLA-F and FLA-R (Smirnov *et al.* 2011). The resulting PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a MEGABACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Barcelona, Spain) in the University of La Laguna Sequencing Services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were aligned using Mega 5.0 software program (Tamura *et al.* 2011). Species identification was based on sequence homology analysis by comparison to the available *Vermamoeba vermiformis* DNA sequences in the Genbank database.

Morphological characterization of amoebic strains using the currently available identification key from Page (Page, 1988), yielded the identification of two (10%) *V. vermiformis* strains from the 20 water samples included in this study (Table I and Fig. 2). After that, molecular characterization of the strains was carried out by using PCR/sequencing of the 18S rDNA gene and confirmed all strains to be members of *V. vermiformis* species (more than 99% homology when compared to the available *Vermamoeba vermiformis* sequences in Genbank).

Regarding studies on FLA in the Canary Islands, pathogenic strains of *Acanthamoeba* genus have been reported in water and soil sources in the island of Tenerife and from soil in Gran Canaria (Lorenzo-Morales *et al.* 2005a, b, 2006, Reyes-Batlle *et al.* 2014). Moreover, strains of *Vermamoeba vermiformis* have also been detected in snow in Tenerife island and water sources in the island of El Hierro. Until now, no studies on the prevalence of FLA in the environment in the island of Lanzarote have been carried out and hence the aim of the present study. Interestingly, positive samples in this work corresponded to regions widely visited by tourists and locals (WSL13 and WSL20 strains) (Table I). The presence of this species in water samples in the island should raise aware-

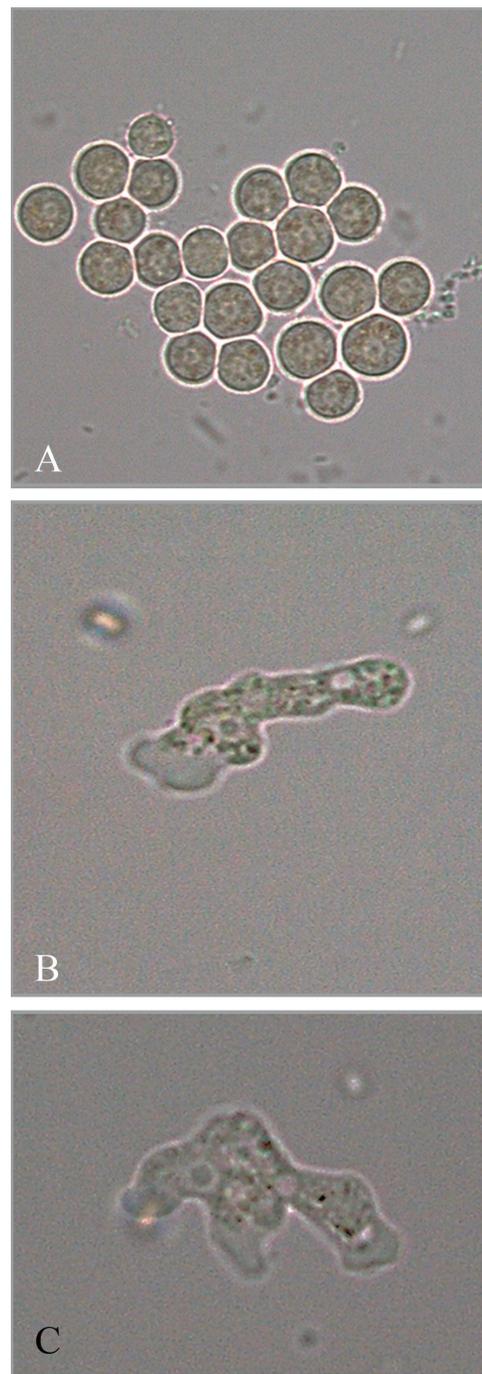


Fig. 2. *Vermamoeba vermiformis* trophozoites (T) and cysts (C) at 100X of magnification isolated in the island of Lanzarote strain: **A** – WSL13 strain Cysts; **B** – WSL13 strain trophozoite; **C** – WSL20 strain trophozoite

- 10.1515/ap-2016-0088

Downloaded from De Gruyter Online at 09/18/2016 06:13:20PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

ness to health authorities since this amoebic species acts as a carrier of pathogens of high medical relevance. Moreover, and to the best of our knowledge, this is the first report of *Vermamoeba vermiformis* species from water sources in the island of Lanzarote.

Acknowledgments. This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain, the Project P113/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III, and Project ref. AGUA3 "Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua" from Cajacanarias Fundación. ALA and MRB were funded by Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación Cajacanarias para Postgraduados 2014". IS was funded by "Ayudas para estancias de estudiantes de posgrado e investigadores americanos y africanos – 2015" of the University of La Laguna. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RYC-2011-08863.

References

- Adamska M., Leonska-Duniec A., Lanocha N., Skotarczak B. 2014. Thermophilic pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. *Acta Parasitologica*, 59, 433–441
- Bonilla-Lemus P., Caballero Villegas A.S., Carmona Jiménez J., Lugo Vázquez A. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental Parasitology*, 145 Suppl, S28–33
- Fouque E., Trouilhé M.C., Thomas V., Humeau P., Héchard Y. 2014. Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration. *Experimental Parasitology*, 145 Suppl, S62–68
- Fouque E., Yefimova M., Trouilhé M.C., Quillard N., Fernandez B., Rodier M.H., Thomas V., Humeau P., Héchard Y. 2015. Morphological Study of the Encystment and Excystment of *Vermamoeba vermiformis* Revealed Original Traits. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 327–337
- Lasjerdi Z., Niyiyati M., Lorenzo-Morales J., Haghghi A., Taghipour N. 2015. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran. *Acta Parasitologica*, 60, 417–422
- Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22, 10
- Lorenzo-Morales J., Monteverde-Miranda C.A., Jiménez C., Tejedor M.L., Valladares B., Ortega-Rivas A. 2005b. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 233–236
- Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Foronda P., Martínez E., Valladares B. 2005a. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*, 95, 273–277
- Page E.C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Cumbria, England, UK
- Pagnier I., Valles C., Raoult D., La Scola B. 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microbial Pathogenesis*, 80, 14–20
- Reyes-Battle M., Niyiyati M., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Valladares B., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Lorenzo-Morales J. 2015. Unusual *Vermamoeba vermiformis* strain isolated from Snow in Mount Teide, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Novelty in Biomedicine*, 3, 189–192
- Reyes-Battle M., Todd C.D., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Cabello-Vilchez A.M., González A.C., Córdoba-Lanús E., Lindo J.F., Valladares B., Piñero J.E., Lorenzo-Morales J. 2014. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, 113, 1383–1388
- Richards A.M., Von Dwingelo J.E., Price C.T., Abu Kwaik Y. 2013. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence*, 4, 307–314
- Smirnov A.V., Chao E., Nassonova E.S., Cavalier-Smith T. 2011. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist*, 162, 545–570
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739
- Thomas V., Loret J.F., Jousset M., Greub G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology*, 10, 2728–2745
- Thomas V., McDonnell G., Denyer S.P., Maillard J.Y. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 231–259

Received: February 16, 2015

Revised: March 14, 2016

Accepted for publication: March 17, 2016

- 10.1515/ap-2016-0088

Downloaded from De Gruyter Online at 09/18/2016 06:13:20PM
via Cornell University Library

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Case Report

First Report of *Vermamoeba vermiformis* in the Island of El Hierro, Canary Islands, Spain

María Reyes-Battle¹, Maryam Niyati², Carolina Wagner^{1,3}, Carmen M. Martín-Navarro¹, Atteneri López-Arencibia¹, Ines Sifaoui^{1,4}, Basilio Valladares¹, Enrique Martínez-Carretero¹, José E. Piñero¹, Jacob Lorenzo-Morales^{1,*}

¹ University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain.

² Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁴ Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

Received: 31 February, 2016; Accepted: 21 April, 2016

Abstract

Background: Free-living amoebae (FLA) are group of protozoa distributed worldwide in many habitats mainly water and soil related sources. Some members of FLA are able to act as opportunistic pathogens and are environmental carriers of other pathogenic agents such as bacteria and viruses. *Vermamoeba vermiformis* is a highly abundant FLA species in water bodies and has recently gained environmental importance as it acts as a vehicle of many pathogenic bacteria such as *Legionella pneumophila*.

Cases Report: In this study, water samples were collected from the island of El Hierro, Canary Islands, Spain during 2015. El Hierro island was designated by UNESCO as a biosphere reserve and it is currently the less populated of the Canary Islands. The water samples were culture on 2 % Non-Nutrient Agar (NNA) plates covered with a thin layer of heat killed *E. coli* and checked daily for the presence of FLA. After a week, *V. vermiformis* amoebae were observed in the plates incubated at room temperature and 37 °C. Molecular characterization was carried out by amplifying the 18S rDNA gene and DNA sequencing, confirming that the isolated strain belonged to *Vermamoeba vermiformis* species.

Conclusion: To the best of our knowledge, this is the first report of *Vermamoeba vermiformis* isolation in the island of El Hierro and the second report of this species in the Canary Islands.

Keywords: *Vermamoeba vermiformis*, water, Canary Islands, Spain

***Corresponding Author:** Dr. Jacob Lorenzo-Morales, University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain. Phone: (+34) 922316502 ext 6111, Fax: (+34) 922318514, Email: jmlorenz@ull.edu.es

Please cite this article as: Reyes-Battle M, Niyati M, Wagner C, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Sifaoui I, et al. First Report of *Vermamoeba vermiformis* in the Island of El Hierro, Canary Islands, Spain. *Novel Biomed.* 2016;4(4):181-4.

Introduction

Free-Living Amoebae (FLA) are of medical importance since they could act as opportunistic

pathogenic agents, but also as vehicles for other pathogens such as bacteria and viruses^{1,2}. Regarding the abundance in water bodies, FLA of *Acanthamoeba* and *Vermamoeba* genus are among the most common

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

ones³⁻⁶.

In the case of *Vermamoeba vermiformis* species, it is important to mention that it has been reported in many areas worldwide and has recently gained medical relevance since it is a vehicle of highly important pathogenic agents such as *Legionella pneumophila*^{7,8}. Furthermore, this amoebic species present a wide distribution and has been described from many habitats including geothermal springs and even snow⁹⁻¹¹.

In this study, water samples from the island of El Hierro were collected and checked for the presence of *V. vermiformis*. Isolated amoebic strain was identified using morphological and PCR/sequencing tools. To the best of our knowledge, this is the first report of *V. vermiformis* species in the island of El Hierro and the second report in the Canary Islands.

Case Report

Sample collection and location: Water samples were collected (triplicate) in the island of El Hierro, Canary Islands, Spain (27° 45' N 18° 00' W) using sterile glass bottles during the summer season of 2015. The samples were kept at 4°C until further processing in the laboratory. The island of El Hierro, nicknamed *Isla del Meridiano* (the Meridian Island), is the smallest and farthest south and west of the Canary Islands in the Atlantic Ocean off the coast of

Africa, with a population of around 10.000 inhabitants. Moreover, the island was designated by UNESCO as a Biosphere Reserve in 2000.

Culture and identification of the amoebae: Water samples were filtered using a vacuum manifold system and 0.45 µm nitrocellulose filters (Pall, Madrid, Spain). Filters were then cultured inverted onto 2% non-nutrient agar (NNA) plates with a layer of heat killed *E. coli* at room temperature and 37 °C and were monitored daily for the presence of FLA as previously described^{11,12}. Plates that were suspicious for amoebae were subcultured until a clean plate was obtained.

DNA isolation and molecular identification by PCR: DNA from cultures identified as positive for FLA by microscopy was extracted as previously described^{11,12} by placing 1-2 ml of amoebae cultures directly into the Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell® 16 Instrument as described in the Maxwell® 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega, Madrid, Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

After that, PCR amplification of the FLA 18S rDNA gene was carried out using a universal primer pair FLA-F and FLA-R¹³. The resulting PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit

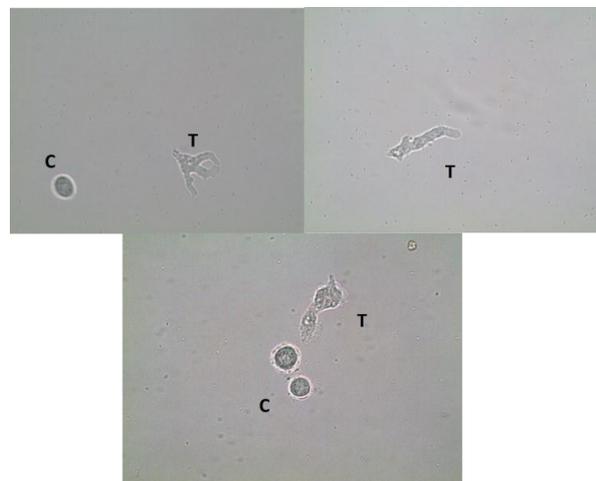


Figure 1. *Vermamoeba vermiformis* trophozoites (T) and cysts (C) at 100X of magnification isolated in the island of El Hierro.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

(Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a MEGABACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Barcelona, Spain) in the University of La Laguna Sequencing Services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were aligned using Mega 5.0 software program¹⁴. Species identification was based on sequence homology analysis by comparison to the available *Vermamoeba vermiformis* DNA sequences in Genbank database. One of the cultured samples in NNA plates was positive for FLA growth under the inverted microscope. After that, pieces of agar from the initial positive plate were subcultured in 2% NNA plates for the isolation of the amoebae until a clean plate was obtained as it was described in the material and methods section. Morphological characterization of the strain using the currently available identification key from Page¹⁵, yielded the identification of this amoebic strain as a member of *V. vermiformis* species (Figure 1A and 1B). Furthermore, molecular characterization of the strain after PCR/sequencing of the 18S rDNA gene confirmed the strain to be a member of *V. vermiformis* species (99% homology when compared to the available *Vermamoeba vermiformis* sequences in Genbank).

Discussion

This is the first report of FLA species in the island of El Hierro from water samples. The positive sample was collected in the area of La Dehesa in Frontera municipality that is a widely visited area with locals and tourists all over the year. The presence of this species in water bodies in the island should raise awareness to health authorities. Moreover and to the best of our knowledge, this is the first report of *Vermamoeba vermiformis* species in the island of El Hierro and the second report of this amoebic species in the Canary Islands.

Acknowledgments

This work was supported by the grants RICET (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain, the

Project PI13/00490 “Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados” from the Instituto de Salud Carlos III, and Project ref. AGUA3 “Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua” from CajaCanarias Fundación. ALA and MRB were funded by Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación Cajacanarias para Postgraduados 2014”. IS was funded by “Ayudas para estancias de estudiantes de posgrado e investigadores americanos y africanos – 2015” of the University of La Laguna. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RYC-2011-08863.

References

1. Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol*. 2008;10:2728-45
2. Pagnier I, Valles C, Raoult D, La Scola B. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb Pathog*. 2015;80:14-20.
3. Fouque E, Yefimova M, Trouilhé MC, Quillard N, Fernandez B, Rodier MH, Thomas V, Humeau P, Héchar Y. Morphological Study of the Encystment and Excystment of *Vermamoeba vermiformis* Revealed Original Traits. *J Eukaryot Microbiol*. 2015; 62(3):327-37.
4. Lorenzo-Morales J, Coronado-Álvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Valladares B. Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am. J. Tropical Med. Hygiene*. 2007;77(4):753-6.
5. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22:10
6. Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu Kwaik Y. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence*. 2013;4(4):307-14.
7. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34:231-59.
8. Fouque E, Trouilhé MC, Thomas V, Humeau P, Héchar Y. Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration. *Exp Parasitol*. 2014;145 Suppl:S62-8.
9. Solgi R, Niyiyati M, Haghighi A, Mojarad EN. Occurrence of Thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* Spp. in Hot Springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iran J Parasitol*. 2012;7(2):47-52.
10. Bonilla-Lemus P, Caballero Villegas AS, Carmona Jiménez J, Lugo Vázquez A. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp Parasitol*. 2014; 145 Suppl:S28-33.
11. Reyes-Batlle M, Niyiyati M, Martín-Navarro CM, López-

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Arencibia A, Valladares B, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Unusual *Vermamoeba vermiformis* Strain Isolated from Snow in Mount Teide, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Novel Biomed.* 2015;3(4):189-92.

12. Reyes-Batlle M, Todd CD, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Cabello-Vilchez AM, González AC, et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol. Res.* 2014;113(4):1383-8.

13. Smirnov AV, Chao E, Nassonova ES, Cavalier-Smith T. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist.* 2011;162:545-70.

14. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution.* 2011;28:2731-9.

15. Page EC. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Cumbria, England, UK. 1988.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain

María Valladares · María Reyes-Battle · Carmen M. Martín-Navarro · Atteneri López-Arencibia · Alexis Dorta-Gorrín · Carolina Wagner · Enrique Martínez-Carretero · José E. Piñero · Basilio Valladares · Jacob Lorenzo-Morales

Received: 5 February 2015 / Revised: 11 February 2015 / Accepted: 15 February 2015 / Published online: 26 February 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The present study describes two cases of *Acanthamoeba* infections (keratitis and ascites/peritonitis) in small breed domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. In both cases, amoebic trophozoites were observed under the inverted microscope and isolated from the infected tissues and/or fluids, without detecting the presence of other viral, fungal or bacterial pathogens. Amoebae were isolated using 2 % non-nutrient agar plates and axenified for further biochemical and molecular analyses. Osmotolerance and thermotolerance assays revealed that both isolates were able to grow up to 37 °C and 1 M of mannitol and were thus considered as potentially pathogenic. Moreover, the strains were classified as highly cytotoxic as they cause more than 75 % of toxicity when incubated with two eukaryotic cell lines. In order to classify the strains at the molecular level, the diagnostic fragment 3 (DF3) region of the 18S rDNA of *Acanthamoeba* was amplified and sequenced, revealing that both isolates belonged

to genotype T4. In both cases, owners of the animals did not allow any further studies or follow-up and therefore the current status of these animals is unknown. Furthermore, the isolation of these pathogenic amoebae should raise awareness with the veterinary community locally and worldwide.

Keywords *Acanthamoeba* · Dog · Infection · Keratitis · Ascites · Canary Islands · Spain

Introduction

Free-living amoebae belonging to the genus *Acanthamoeba* and the species *Naegleria fowleri* and *Balamuthia mandrillaris* are causative agents of lethal encephalitis and multi-systemic infections as well as keratitis (in the case of *Acanthamoeba* genus) in humans and other animals (Siddiqui and Khan 2012; Lorenzo-Morales et al. 2013).

There are reports worldwide of these opportunistic pathogens as causative agents of infections in various members of the animal kingdom such as cattle, birds and horses. Focusing on *Acanthamoeba* genus and infections in domestic animals, these amoebae have been reported as causative agents of encephalitis in three dogs (Pearce et al. 1985; Bauer et al. 1993; Brofman et al. 2003), five cases of disseminated infections (Ayers et al. 1972; Dubey et al. 2005; Reed et al. 2010; Kent et al. 2011; Valladares et al. 2014) and a case of prostatitis (Lorenzo-Morales et al. 2013). Furthermore, *Balamuthia mandrillaris* has been previously reported as the causative agent of meningoencephalitis in three dogs (Foreman et al. 2004; Finnin et al. 2007; Hodge et al. 2011). No natural cases of *Naegleria fowleri* infections in domestic animals have been described so far.

Communicated by Erko Stackebrandt.

M. Valladares · M. Reyes-Battle · C. M. Martín-Navarro · A. López-Arencibia · A. Dorta-Gorrín · C. Wagner · E. Martínez-Carretero · J. E. Piñero · B. Valladares · J. Lorenzo-Morales (✉)

University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain
e-mail: jmlorenz@ull.edu.es

M. Valladares
Laboratorio Finca España, La Laguna, Tenerife, Spain

C. Wagner
Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Departamento de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

 Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

To date, *Acanthamoeba* genus is classified at the genotype level (19 different genotypes, T1–T19) based on rRNA gene sequencing (Booton et al. 2005; Nuprasert et al. 2010; Qvarnstrom et al. 2013; Magnet et al. 2014). Strains of *Acanthamoeba* belonging to genotype T4 have been isolated in 90 % of the reported clinical cases worldwide, although genotypes such as T1, T3, T5, T10, T11, T15, T17 and T18 are also related to amoebic infection cases in humans and other animals (Lorenzo-Morales et al. 2013; Qvarnstrom et al. 2013).

In this study, *Acanthamoeba* strains belonging to genotype T4 were isolated from a case of canine keratitis and ascites/peritonitis. To the best of our knowledge, this is the first report on the isolation of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains in dogs suffering the conditions mentioned above in Spain and worldwide.

Materials and methods

Animal samples

Corneal swabs and tears were collected from a dog suffering from keratitis. In the case of the dog suffering with ascites, the fluid of the peritoneal cavity was collected and kept in sterile tubes until culture. It is important to mention that no bacterial, viral, fungal or yeast agents were identified in these samples and therefore were submitted to our laboratory to check for the presence of free-living amoebae.

Culture and identification of the amoebae

Amoebae were observed under the microscope directly from peritoneal fluid, and corneal swab samples were cultured on 2 % non-nutrient agar (NNA) plates at 22 and 37 °C and were monitored daily for the presence of free-living amoebae as previously described (Lorenzo-Morales et al. 2006) with an overlayer of *Escherichia coli* suspension that had been heat inactivated (2 h at 60 °C). The isolates were cultured axenically in 75-cm² culture tissue flask without shaking, at 28 °C, in PYG medium [0.75 % (wt/vol) proteose peptone, 0.75 % (wt/vol) yeast extract and 1.5 % glucose] supplemented with 20 µg/ml of gentamicin.

DNA isolation

DNA from cultures identified as positive for amoebae by microscopy was extracted by placing 1–2 ml of amoeba cultures directly into the Maxwell[®] 16 Tissue DNA Purification Kit sample cartridge (Promega, Madrid, Spain). Amoebic genomic DNA was purified using the Maxwell[®] 16 Instrument as described in the Maxwell[®] 16 DNA Purification Kits Technical Manual #TM284 (Promega, Madrid,

Spain). DNA yield and purity were determined using the NanoDrop[®] 1000 spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

18S rDNA gene amplifications for *Acanthamoeba* (DF3 region) were performed as previously described (Booton et al. 2005; Niyiyati et al. 2009). The resulting PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a MEGA-BACE 1000 automatic sequencer (Healthcare Biosciences, Barcelona, Spain) in the University of La Laguna Sequencing Services (Servicio de Secuenciación SEGAI, University of La Laguna). Sequences were aligned using Mega 5.0 software program (Tamura et al. 2011). Genotype identification was based on sequence analysis of DF3 region as previously described by comparison to the available *Acanthamoeba* DNA sequences in GenBank database (Booton et al. 2005; Niyiyati et al. 2009). *Acanthamoeba castellanii* Neff ATCC 30010 DNA was used as a positive control in the PCR reactions.

Phylogenetic analyses for the obtained sequences were carried out using maximum parsimony, minimum evolution and maximum likelihood optimality criteria, implemented in Mega 5.0 (Tamura et al. 2011). Transition/transversion ratios were estimated by maximum likelihood heuristic searches. Estimates of node support were obtained by performing 1000 bootstrap replicates. Obtained sequences were compared to sequences available in GenBank database. The sequences for the new isolates are deposited in the GenBank database under the accession numbers: KP728281–KP728282.

Tolerance assays

Osmotolerance of the isolated amoebae was assayed by incubating the strains onto 2 % non-nutrient agar plates containing mannitol 0.5, 1.0 and 1.5 and seeded with heat-killed *E. coli*. Approximately 10³ trophozoites were inoculated onto the centre of non-nutrient agar plates. Plates were observed for amoebae growth with an inverted microscope after 24, 48 and 72 h. To investigate thermotolerance, approximately 10³ trophozoites were inoculated in the centre of non-nutrient agar plates seeded with heat-killed *E. coli*. The plates were incubated at 28, 37 and 42 °C and monitored using an inverted microscope for amoebae growth after 24, 48 and 72 h. Approximately 10³ trophozoites were inoculated in the centre of new non-nutrient agar plates seeded with heat-killed *E. coli* incubated at room temperature, and monitored for growth after 24, 48 and 72 h. This plate was used as a control. The procedure was repeated using previously established thermo- and osmotolerant *Acanthamoeba* strains as positive controls (Martín-Navarro et al. 2008).

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Cytotoxicity assays

The two cell lines that were used in this study, J774A.1 murine macrophages (ATCC # TIB-67) and HeLa cells (ATCC # CCL-2), were maintained as monolayer cultures at 37 °C in 5 % CO₂ in T-75 culture flasks (Corning, Madrid, Spain). Cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle medium without phenol red (DMEM, Sigma, Tres Cantos, Madrid, Spain) supplemented with 10 % foetal calf serum, 2 mM glutamine and 20 µg/ml gentamicin (Biochrom AG, Cultek, Granollers, Barcelona, Spain) and subcultured two times per week.

Cytotoxicity assays were performed using a cytotoxicity detection kit based on the release of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain) as previously described (Lorenzo-Morales et al. 2005; Martín-Navarro et al. 2010). Briefly, the two cell lines were grown to monolayers in 6-well plates. Both isolated *Acanthamoeba* strains (10⁵ amoebae/well) were incubated with the cell monolayers in foetal calf serum-free DMEM at 37 °C in 5 % CO₂. Cell monolayers were observed periodically for cytopathic effects for up to 24 h. At the end of this incubation period, cytopathic effects were assessed visually after haematoxylin staining. In addition, supernatants were collected and cytotoxicity was determined by measuring LDH release following manufacturer's instructions. Control values were obtained from each cell line incubated alone in foetal calf serum-free DMEM without phenol red. Total LDH release was determined from each cell line treated with 2 % Triton X-100 (Sigma, Tres Cantos, Madrid, Spain).

Results and discussion

In both cases reported in this study, no other pathogen was isolated from the eye or the peritoneal fluid of the animals. Therefore and due to recent descriptions of amoebic infection cases in the Canary Islands, samples were submitted to our laboratory to check for the presence of potentially pathogenic free-living amoebae.

Upon observation of corneal swab and peritoneal fluid microscopically, the presence of amoebic trophozoites was revealed. After that, drops of peritoneal fluid and part of the corneal swab were cultured in 2 % NNA plates for the isolation of the amoebae. After this process, DNA was extracted directly from the samples and also from the amoebic cultures and DF3 fragment PCR (*Acanthamoeba*) was carried out in order to verify the microscopy observations. PCRs were also positive for these cultures and after purification (Fig. 1). Furthermore, the obtained sequences (direct fluid/swab and culture of fluid/swab) allowed the

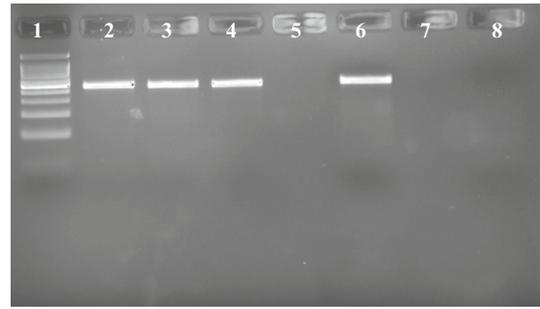


Fig. 1 Diagnostic fragment 3 PCR of the tested samples. Lane 1 100 bp DNA ladder; lane 2 corneal swab; lane 3 peritoneal fluid; lane 4 peritoneal fluid culture in NNA plates; lane 6 positive control *Acanthamoeba castellanii* Neff ATCC 30100 DNA; Lane 7 negative control. Lanes 5 and 8 are empty

Table 1 (A) Characteristics of the isolated strains in this study. (B) Cytotoxicity levels induced by the isolated strains when incubated with murine macrophages and HeLa cells

Isolate	Source	Pathogenic potential		Genotype
		Temperature tolerance 37 °C	Osmotolerance 1 M mannitol	
(A)				
TFD1	Corneal swab	+++	+	T4
TFD2	Peritoneal fluid	+++	++	T4
Isolate		Eukaryotic cell line		
Toxicity		J774.1	HeLa	
(B)				
TFD1		78 ± 3.75	79 ± 2.01	
TFD2		81 ± 4.03	91 ± 3.52	

classification of both isolates into *Acanthamoeba* genotype T4. Both strains were able to grow at temperatures up to 37 °C and 1 M of mannitol, induced high cytotoxicity levels when tested against the eukaryotic cell lines and were thus considered as pathogenic (Table 1).

Most of the previously reported cases of infections in dogs (Ayers et al. 1972; Bauer et al. 1993; Brofman et al. 2003; Dubey et al. 2005; Kent et al. 2011; Valladares et al. 2014) were manifesting as encephalitis or multisystemic disseminated infections. Although the symptoms of multisystemic infection of *Acanthamoeba* in the dog are variable, typical cases involve the loss of appetite, fever, discharges from the nose and eyes, and neurological signs such as neck and limb stiffness. Younger dogs are more likely to succumb to *Acanthamoeba* infection as are immunosuppressed dogs.

Acanthamoeba genotype T4 is the genotype most often associated with human infection (Booton et al. 2005), but it is also the most commonly isolated genotype from the environment. However, a statistical analysis shows that the frequency of T4 association with human disease is not explained by its frequency in the environment alone (Maciver et al. 2013), and so in humans at least T4 is specifically pathogenic. Previous work from our group has shown that potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains are present in a variety of sources in the Canary Islands (Lorenzo-Morales et al. 2005; 2007; Reyes-Battle et al. 2014). The conclusion of these studies is that as elsewhere T4 is the dominant genotype. To date, too few infections with *Acanthamoeba* in dogs have been genotyped to determine whether T4 is also the most frequently infective genotype as it is in humans and for AK in cats (Ithoi et al. 2013). Interestingly, two previous cases of *Acanthamoeba* infection in dogs were found to be T1 (Dubey et al. 2005; Kent et al. 2011), a genotype that has been found to infect humans, but at very low frequency. We are aware of only three cases in which the genotype of a dog infection was found to be T4 and two of them were recent reports by our laboratory in dogs (one case of prostatitis and a case of multisystemic infection) from Tenerife (Lorenzo-Morales et al. 2014; Valladares et al. 2014). The T4 strains in both Tenerife cases are only 97 % identical indicating that they are not the same strain of *Acanthamoeba* (Valladares et al. 2014).

In a recent study of *Acanthamoeba* isolated from skin lesions and nasal mucosa of dogs in Porto Alegre, Brazil, five out of thirteen isolates were T4 with four T5s, three T3s and one T16 (Carlesso et al. 2014). Although there was no evidence for these *Acanthamoeba* being the cause of the lesions, it is possible that pathogenic amoebae gain entry to the dogs through these sites and possibly the nasal mucosa. In the reported case, the slight immunosuppression stage that was observed seems to have played an important role in the progress of the infection. In the reported cases in our study, the cause of infections was not established since the owners did not allow further studies in the animals and rejected to give further information about the status and the environments that both animals were experiencing. To the best of our knowledge, this is the first report on the isolation of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains in dogs suffering the conditions mentioned above in Spain and worldwide.

Acknowledgments This work was supported by the grants RICET (Project No. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain, the Project PI13/00490 “Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados” from the Instituto de Salud Carlos III and Project ref. AGUA3 “Amebas de Vida Libre como Marcadores de Calidad del Agua” from

CajaCanarias Fundación. ALA and MRB were funded by “Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación Cajacanarias para Postgraduados 2014”. JLM was supported by the Ramón y Cajal Sub-programme from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness RYC-2011-08863.

References

- Ayers KM, Billups LH, Garner FM (1972) *Acanthamoebiasis* in a dog. *Vet Pathol* 9:221–226
- Bauer RW, Harrison LR, Watson CW, Styer EL, Chapman WL Jr (1993) Isolation of *Acanthamoeba* sp. from a greyhound with pneumonia and granulomatous amoebic encephalitis. *J Vet Diagn Invest* 5:386–391
- 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* 43:1689–1693
- Brofman PJ, Knostman KAB, DiBartola SP (2003) Granulomatous amoebic meningoencephalitis causing the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in a dog. *J Vet Int Med* 17:230–234
- Carlesso AM, Mentz MB, da Machado MLS, Carvalho A, Nunes TET, Maschio VJ, Rott MB (2014) Characterization of isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs. *Curr Microbiol* 68:702–707
- Dubey JP, Benson JE, Blakeley KT, Booton GC, Visvesvara GS (2005) Disseminated *Acanthamoeba* sp. infection in a dog. *Vet Parasitol* 128:183–187
- Finnin PJ, Visvesvara GS, Campbell BE, Fry DR, Gasser RB (2007) Multifocal *Balamuthia mandrillaris* infection in a dog in Australia. *Parasitol Res* 100:423–426
- Foreman O, Sykes J, Ball L, Yang N, De Cock H (2004) Disseminated infection with *Balamuthia mandrillaris* in a Dog. *Vet Pathol* 41:506–510
- Hodge PJ, Kelers K, Gasser RB, Visvesvara GS, Martig S, Long SN (2011) Another case of canine amoebic meningoencephalitis—the challenges of reaching a rapid diagnosis. *Parasitol Res* 108:1069–1073
- Ithoi I, Mahmud R, Abdul Basher MH, Jali A, Abdulsalam AM, Ibrahim J, Mak JW (2013) *Acanthamoeba* genotype T4 detected in naturally-infected feline corneas found to be in homology with those causing human keratitis. *Trop Biomed* 30(1):131–140
- Kent M, Platt SR, Rech RR, Eagleson JS, Howerth EW, Shoff M, Fuerst PA, Booton G, Visvesvara GS, Schatzberg SJ (2011) Multisystemic infection with an *Acanthamoeba* sp in a dog. *JAVMA* 238:1476–1481
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B (2005) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res* 95(4):273–277
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Martínez E, Khoubbane M, Artigas P, Periago MV, Foronda P, Abreu-Acosta N, Valladares B, Mas-Coma S (2006) *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Trop* 100(1–2):63–69
- Lorenzo-Morales J, Coronado-Álvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, 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, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B (2013) *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol* 29:181–187

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

- Lorenzo-Morales J, Valladares M, Sancho J, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, López-Medina L, Piñero JE, Valladares B (2014) First report of a case of prostatitis due to *Acanthamoeba* in a dog. *Acta Protozool* 52:325–329
- 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 pathogenic genotype. *Eur J Protistol* 49(2):217–221
- Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C (2014) Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res* 113:2845–2850
- Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Cabrera-Serra MG, Rancel F, Coronado-Alvarez NM, Piñero JE, 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* 57:1399–1404
- Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Machín RP, López-Arencibia A, Valladares B, Piñero JE (2010) *Acanthamoeba* spp.: in vitro effects of clinical isolates on murine macrophages, osteosarcoma and HeLa cells. *Exp Parasitol* 126(1):85–88
- Niyayati M, Lorenzo-Morales J, Rahimi F, Motevalli-Haghi A, Martín-Navarro CM, Farnia S, Valladares B, Rezaeian M (2009) Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:425–427
- 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* 48:4636–4640
- Pearce JR, Powell HS, Chandler FW, Visvesvara GS (1985) Amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 187:951–952
- 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* 60:626–633
- Reed LT, Miller MA, Visvesvara GS, Gardiner CH, Logan MA, Packer RA (2010) Diagnostic exercise. Cerebral mass in a puppy with respiratory distress and progressive neurologic signs. *Vet Pathol* 47:1116–1119
- Reyes-Batlle M, Todd CD, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Cabello-Vilchez AM, González AC, Córdoba-Linús E, Lindo JF, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2014) Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res* 113(4):1383–1388
- Siddiqui R, Khan NA (2012) Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 5:6
- 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* 28:2731–2739
- Valladares M, Reyes-Batlle M, Mora-Peces I, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorrín A, Comyn-Afonso E, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J (2014) A multisystemic *Acanthamoeba* infection in a dog in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Vet Parasitol* 205:707–711

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Artículos

- **Hallazgos de Amibas de Vida Libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana.**
- **Introducción**
- **Pacientes y métodos**
- **Resultados**
- **Discusión**
- **Apéndice (videos)**
- **Referencias**

M.V. Pérez de Galindo

mavpega@gmail.com
 Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

M. Galindo

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

A. Dorta

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

C. Guzmán de R

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

C. Wagner

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

M.A. Vethencourt

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

A. Nessi

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

A. Bermúdez

Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario de Caracas

E. Pérez de Suárez

Laboratorio de Amibias. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Parasitología**Hallazgos de Amibas de Vida Libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana.**

Fecha de recepción: 05/06/2012
 Fecha de aceptación: 22/07/2012

Las Amibas de Vida Libre (AVL), se han demostrado en diversos hábitat a los que acceden los humanos. Entre ellas, son agentes causales de enfermedad *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* sp. Su diagnóstico no debe ser fortuito o consecuencia del resultado negativo a la búsqueda de patógenos tradicionales, la gravedad de las enfermedades producidas, amerita investigarlas y prepararnos para su diagnóstico oportuno. La metodología basada en examen directo, inducción del flagelado, coloraciones y cultivo, permitió el diagnóstico de *Acanthamoeba* sp. y *Naegleria fowleri* en 32 de 530 muestras examinadas. Nos permitimos recomendar esta metodología para laboratorios asistenciales y de investigación, para un diagnóstico temprano, o para obtener aislados de estas amibas. El estudio morfológico, biológico e identificación hasta género, es suficiente para instaurar tratamiento. Corroboramos las observaciones de otros autores, sobre prevalencia de enfermedades por AVL y se demuestra que su gravedad y elevada mortalidad justifican su búsqueda.

Palabras Claves: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, Amibas de Vida Libre, diagnóstico de Amibas de Vida Libre, Venezuela

Title

Free Living Amoebae of *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in Venezuelan patients

Abstract

Free-living amoebae (FLA) have been found in almost all habitats shared with humans. Several genera and species are causative agents of disease, including *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba* sp. Their diagnosis cannot be incidental or be a product of negative results for traditional pathogens. Severity of these infections warrants its investigation and early detection. Laboratory methodology using direct examination, flagellate induction, staining techniques and cultures in biphasic medium, allowed the detection of 32 *Acanthamoeba* and *Naegleria* infections in 530 tested samples. We recommend this methodology for both diagnostic and research purposes, thus allowing an early diagnosis or to obtain strains of these amoebae. Morphological and biological studies and genus identification are enough to establish treatment. We agree with other authors about FLA ubiquitous distribution and their low disease prevalence, but the severity and high mortality of these infections justify all efforts made towards a correct and early diagnosis.

Key Word

Acanthamoeba, *Naegleria*, Free-living amoebae. Diagnosis, Venezuela

Hallazgos de Amibas de Vida Libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana.

Introducción

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoarios, llamados "anfizoicos", por ser de vida libre o parasitaria⁽¹⁾. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, demostrándose la patogenicidad de algunos géneros. Se han aislado de diferentes ambientes, agua potable y no potable, suelo, interfases agua-suelo, agua-animal, agua-plantas, agua-aire, donde encuentran bacterias, hongos y protozoarios para alimentarse, unidades de ventilación y de aire acondicionado, unidades de diálisis, de lavado gastrointestinal, dentales, lentes de contacto y

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

sus soluciones de lavado⁽²⁾. El conocimiento de su capacidad de producir enfermedad en el humano se tiene desde hace pocos años. Anteriormente eran consideradas como organismos del suelo o comensales en mamíferos. Representan un grupo de microorganismos oportunistas y un grupo emergente de parásitos para el humano y otros animales^(3,4). El descubrimiento de su capacidad de infectar al hombre y otros mamíferos causando afecciones fatales, revolucionó el concepto de parasitismo, rompiendo la barrera que separaba los organismos de vida libre de los parásitos⁽⁵⁾.

Las AVL también son portadoras de bacterias patógenas, virus y micoplasma, los cuales no son digeridos porque resisten las enzimas lisosomales, particularmente y por razones desconocidas, en las del género *Acanthamoeba*, se han encontrado *Mycobacterium bovis*, *Legionella pneumophila*, *Micobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli* serotipo O157, *Chlamydia* sp, *Parachlamydia acanthamoebae*, *Neochlamydia hartmannellae*, *Rickettsia-like*, *Simkania negevensis*, *Vibrio cholerae*, y *Cryptococcus neoformans*^(2,6,7). Entre ellos se destaca *Pseudomonas aeruginosa*, importante patógeno⁽⁸⁾. Estas bacterias han sido llamadas bacterias amebo-resistentes y en consecuencia las amibas se transforman en riesgosos vectores de estos patógenos al humano, ya que no solo resisten la acción de la amiba, sino que las bacterias se multiplican dentro de ella, ocurriendo un proceso de endosimbiosis^(9,10). Se considera que estas bacterias en endosimbiosis, pueden jugar un papel importante en la patogenicidad de las amibas⁽⁶⁾ y su crecimiento dentro de las mismas, puede incrementar la resistencia bacteriana a los antibióticos, así como la virulencia bacteriana.⁽¹¹⁾

Las AVL, se mantienen en la naturaleza cumpliendo su ciclo de vida sin hospedero intermediario, alimentándose principalmente de bacterias y hongos del ambiente.^(3,4,11) Las del género *Acanthamoeba* en el ambiente se mantienen como trofozoitos ameboides. Se enquistan ante situaciones desfavorables, tales como falta de alimento, desecación, acumulación de productos de desecho y agentes químicos. Pueden sobrevivir bajo la forma de quistes, hasta 20 años y las que producen queratitis, hasta 14 días en soluciones oftálmicas^(3,4). Las amibas del género *Naegleria* no se aíslan de ambientes tan variados como las del género *Acanthamoeba*, ya que son muy sensibles a las condiciones de sequedad y pH extremos, no pueden vivir sin agua. Se reconocen alrededor de 30 especies, pero solamente *Naegleria fowleri* ha sido aislada de humanos produciendo MAP. *Naegleria australiensis*, *Naegleria italica* y *Naegleria philippinensis* son patógenas para el ratón. *Naegleria fowleri* es termotolerante y ha sido aislada de diferentes colecciones de agua dulce, hasta de aguas termales⁽⁴⁾.

Morfología

Género *Acanthamoeba*: Las amibas pertenecientes a este género, presentan dos formas evolutivas: Trofozoito ameboides y Quiste.

Trofozoitos: De tamaño variable, entre 15 mm y 40 mm, presentan un pseudópodo anterior, ancho hialino, con producción de filopodios (acantopodios), generalmente se observan en el pseudópodo anterior y algunas veces en la parte posterior. Son proyecciones más o menos cortas y se pueden extender a lo largo de toda la membrana celular, ensanchando su superficie.^(4,5,12) En las amibas patógenas se observan más acantopodios⁽⁴⁾. Hay diferencia entre ectoplasma y endoplasma, con numerosas vacuolas digestivas⁽⁵⁾. Su movimiento es lento, con emisión de 1 ó 2 pseudópodos, los cuales se alargan y ensanchan lentamente. Presentan una vacuola contráctil generalmente hacia el extremo posterior. Son uninucleados, con un gran nucleolo rodeado de un halo claro.^(4,5,12)

Quistes: Los quistes constan de una parte interna, endoquiste, el cual es más o menos poliédrico o estrellado, presentando puntas y una externa, ectoquiste, el cual es generalmente arrugado (rugoso o plegado). De forma biconvexa o poliédrica dependiendo de la distribución de las puntas del endoquiste. Presentan un solo núcleo y se observan pequeños gránulos en la periferia del citoplasma. Miden desde 13 mm a 30 mm. El desenquistamiento se produce a través de algún poro de los que existen en los puntos de contacto del endoquiste con el ectoquiste^(4,5,12).

Género *Naegleria*: Son ameboflagelados, ya que presentan un estado de trofozoito flagelado en su ciclo evolutivo, además de trofozoito ameboides y quiste⁽¹²⁾.

Trofozoito ameboides. Mide de 10 mm a 35 mm, se observa clara diferenciación entre endoplasma y ectoplasma, presenta un núcleo con un gran cariósoma rodeado de un halo claro presentando granos perinucleares⁽¹⁾. Se observa una vacuola contráctil, y pequeñas vacuolas digestivas. Se desplaza por la emisión de pseudópodos eruptivos, hialinos, redondeados y con frecuentes cambios de dirección, puede presentar uno o dos pseudópodos a la vez, observándose en forma de salchicha o de dedos de guante con movimientos rápidos.^(4,5,13)

Trofozoito flagelado: El flagelado presenta forma ovalada o redondeada, con un diámetro de 8 mm a 20 mm, presenta dos flagelos, aunque ocasionalmente pueden encontrarse con uno solo. Puede evidenciarse el núcleo de las AVL, colocado siempre hacia el extremo anterior respecto a la dirección del movimiento y una vacuola contráctil colocada siempre hacia el extremo posterior, posición característica del género^(4,7,12). Los flagelos aparecen cuando la amiba sufre una transformación morfogenética, el flagelado es un estado transitorio. Se describe que varias especies de *Naegleria*, diferentes a *Naegleria fowleri*, carecen de estado flagelar o éste puede dividirse^(3,4). Los quistes son redondeados u ovalados, uninucleados, miden de 15 mm a

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

18 mm de diámetro y la pared es muy refringente⁽¹²⁾

Pacientes y métodos

En 530 personas, con diversos síntomas, fue investigada la presencia de AVL, mediante el análisis de diversas muestras, incluyendo lentes de contacto o líquido de lavado para el cuidado de dichos lentes. Entre estas 530 personas, 273 presentaban síntomas oftalmológicos, 30 síntomas neurológicos, 79 eran usuarios de lentes de contacto, 61 pacientes tenían rinitis, 30 diarrea, 3 otitis y 54 eran personas asintomáticas. De los 273 pacientes con síntomas oftalmológicos, 236 tenían UC unilateral y dos de ellos presentaban úlcera bilateral, por lo cual se examinaron un total de 238 muestras de este tipo de lesión. Además, se examinó muestras a 2 pacientes con queratitis y a 31 pacientes con conjuntivitis crónica que no respondían a los tratamientos usuales. También fueron analizadas 2 corneas recién extraídas, que fueron remitidas al laboratorio, posterior a un procedimiento quirúrgico. De los 30 pacientes con síntomas neurológicos, se examinó el LCR a 28 ellos y material de absceso cerebral en 2 pacientes.

A 79 usuarios de lentes de contacto, se le estudiaron sus lentes y/o los líquidos de lavado, 49 presentaban síntomas que iban desde prurito y ardor hasta UC y 30 eran asintomáticos.

En resumen, se examinaron muestras de LCR, muestras de úlcera corneal, cornea, hisopado conjuntival, líquido de lavado de lentes de contacto, lentes de contacto, absceso cerebral, hisopados nasales, heces y secreción ótica.

Todos los aspectos relacionados con esta investigación se realizaron ajustados a las normas y procedimientos bioéticos que rigen la investigación en humanos, garantizando la confidencialidad en el manejo de los datos personales de los individuos. Asegurando la comprensión del procedimiento a seguir y el riesgo-beneficio, para obtener su consentimiento.

Muestras: toma, transporte y procesamiento. Las muestras fueron tomadas en los servicios médicos especializados, dependiendo de la sintomatología del paciente y algunas en el Laboratorio de Amibiasis, como los hisopados nasales y de fondo de saco del ojo, lentes y solución de lavado. Una vez tomadas, fueron trasladadas, en cámara húmeda y medios de transporte al Laboratorio de Amibiasis, para la investigación parasitológica y a los laboratorios de Micología y Bacteriología.

El procesamiento de las muestras, se realizó en general, mediante examen microscópico directo (entre lámina y laminilla), añadiendo una gota de medio líquido, de Page modificado por Chinchilla y cols. (1979) ⁽¹⁴⁾, que llamaremos medio de Chinchilla líquido, si la muestra lo ameritaba. Cultivo en placas con medio de sólido, (al medio líquido le añadimos la cantidad de agar, recomendada por Chinchilla y cols.). A dicha placa, una vez colocada la muestra, se le añadía 0,5 ml de suspensión de *Escherichia coli*, vivas o muertas, ajustada a 27% de turbidez, 36% de transmitancia y 0,56-0,45 de absorbancia (concentración ajustada al patrón Mac Farland). El cultivo se completaba hasta 8-10 ml, con medio de cultivo de Chinchilla líquido, transformándose en un cultivo bifásico. Se incubaron, los cultivos, hasta por 8 días, a 37°C y 42°C, realizando observaciones diarias, con microscopio invertido. En el lugar de la toma de la muestra se realizaron controles de ambiente, con placas de medio de Chinchilla las cuales fueron abiertas y mantenidas mientras se tomaba la muestra y se procesaron en idéntica forma que las que contenían las muestras.

Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)—El LCR fue tomado por el médico, bajo condiciones de esterilidad, trasladado al laboratorio a temperatura ambiente y con medidas de bioseguridad. Se procesó inmediatamente y el remanente, se conservó a temperatura ambiente, hasta culminar todos los estudios. Se realizó un examen microscópico del LCR, antes y después de centrifugar a 400 g, 5 minutos para buscar trofozoítos móviles. A partir del sedimento, se realizó un examen directo y 2 frotis para coloración con Giemsa y Hematxilina Eosina. Se sembró 1 ml del LCR en medio de cultivo de Page. Se realizó la prueba de flagelación, del líquido recién tomado y posteriormente del cultivo positivo para AVL.

Prueba de flagelación: Se colocaron 2-3 gotas del líquido en un tubo de ensayo, con 2-3 ml de agua destilada estéril, se incubó a 37 °C y 42 °C hasta por 8 días. La evaluación microscópica se hizo tomando alícuotas, para observar entre lámina y laminilla.

A partir de los cultivos positivos, la prueba se realizó de dos maneras:

- El material que se recogió de la placa con crecimiento fue colocado en una placa de Petri vacía y estéril, se le añadió 10 ml de agua destilada estéril. Se incubó a 37 °C y 42 °C, observando al microscopio invertido, cada media hora o hasta observar los flagelados. También se examinó microscópicamente entre lámina y laminilla.
- En la placa de cultivo donde se observó trofozoítos ameboides, se le retiró el medio líquido, sin desprender las amibas y se añadió 10 ml de agua destilada estéril y se continuó en igual forma que en el procedimiento anterior.

Muestras oftalmológicas y muestras de úlcera corneal (UC)

Estas muestras fueron tomadas por un oftalmólogo, previa anestesia tópica con clorhidrato de proparacaina al 0,5%, utilizando el microscopio de la lámpara de hendidura, para identificar los bordes de la lesión, de los cuales se tomaron varias muestras utilizando un bisturí Nº 15, raspando la lesión, y se procesaron de la siguiente manera: Un primer raspado, se colocó entre lámina y laminilla con una gota de medio líquido y se transportó en cámara húmeda al Laboratorio, donde se realizó el examen microscópico directo. El segundo raspado se colocó en un frasco estéril con tapa de goma con 2,5 ml de medio líquido de Chinchilla estéril, para transportarlo al laboratorio. Al llegar al Laboratorio se colocó el contenido del segundo frasco en dos placas de medio de Chinchilla sólido, se añadió la suspensión bacteriana y hasta 8 ml de medio líquido de Chinchilla y se incubó a 37°C. También se tomaron muestras por triplicado con hisopo estéril, para investigación micológica y bacteriológica, para lo cual se sembraron en medio de Saboureaud y Caldo Todd y fueron procesadas en los laboratorios de Microbiología y

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Micología.

Cornea recién extraída

Esta muestra fue tomada por un oftalmólogo y enviada al laboratorio. Una vez allí, la muestra se fragmentó a fin de sembrar varias placas y aumentar las posibilidades del hallazgo de *Acanthamoeba*. Cada fragmento se cultivó y se procedió igual que para la muestra de UC.

Hisopado conjuntival

Se tomaron muestras del fondo de saco conjuntival con hisopos estériles, se realizó examen microscópico directo y cultivo en los medios de Chinchilla líquido, Saboureaud y Caldo Todd. Los hisopos con la muestra se colocaron en frascos con 2,5 ml de medio líquido de Chinchilla y se procedió igual que para la muestra de UC. El material conjuntival recogido con uno de los hisopos se colocó en una lámina, para observación microscópica entre lámina y laminilla.

Lentes de contacto y líquidos usados para su cuidado

Se examinaron los lentes al microscopio invertido, colocándolos en una placa de Petri estéril. Posteriormente se pasaron a una placa con medio de Chinchilla sólido y se añadió 1 ml de medio líquido de Chinchilla, suficiente para cubrirlos y se incubaron a 37°C por un máximo de 10 minutos, al cabo de los cuales, se retiraron los lentes y se colocaron en Caldo Todd, por 10 minutos. A la placa donde estuvieron los lentes, se le añadió medio de cultivo de Chinchilla líquido y suspensión bacteriana y se procesaron como se explicó para las muestras anteriores.

Solución usada para el cuidado de los lentes

Se tomaron muestras tanto de la solución usada, contenida en el estuche donde se guardaban los lentes, como la no usada de los frascos que llevó el paciente. Cada solución se procesó tal y como se describió anteriormente, para la investigación de AVL, hongos y bacterias.

Búsqueda de portadores asintomáticos

Se seleccionaron personas sin ningún tipo de sintomatología, que accedieron voluntariamente a participar en el estudio. Se tomaron hisopados de cada fosa nasal y se realizó exudado faríngeo, estas muestras fueron procesadas tal como se describió anteriormente para las muestras tomadas con hisopos, tanto para la investigación de AVL, como para la de hongos y bacterias.

En este estudio descriptivo, los datos fueron expresados a manera de porcentajes. La prueba de *chi cuadrado* se usó para comparar las variables. Las diferencias presentadas con una $p \leq 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Resultados

Mediante la metodología descrita, se observaron amibas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*, en 32 casos, lo que representa el 6% de todas las muestras estudiadas ($n = 530$). El hallazgo de amibas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* de acuerdo a la procedencia de la muestra se describe en la tabla 1.

Tabla 1.

Amibas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* halladas en las diferentes muestras examinadas. ($n = 32$)

Procedencia de la muestra	Hallazgo de AVL	%
Úlceras Corneales	13	40,6
Queratitis	1	3,1
Conjuntivitis	4	12,5
LCR	2	6,3
Absceso cerebral	1	3,1
Diarrea	3	9,4
Lentes y/o liq.	7	21,9
Ex. Nasal de Portador Asin.	1	3,1
Total	32	100

En todas las muestras, se encontró *Acanthamoeba* sp, excepto el la muestra de LCR, donde se encontró *Naegleria fowleri*

AVL = Amiba de Vida Libre
 Liq. = Líquido contenido en la caja donde se guardan los lentes
 MAP = Meningoencefalitis Amibiana Primaria
 LCR = Líquido cefalorraquídeo
 Ex. Nasal de Portador Asin. = Exudado nasal de portador asintomático

Entre las 273 muestras de pacientes con afecciones oculares, se encontró *Acanthamoeba* sp en 18 casos (6,6%), que se presentan en la tabla 2.

Tabla 2.

Hallazgo de *Acanthamoeba* sp en muestras provenientes de pacientes con síntomas oculares. ($n = 18$).

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Procedencia de la muestra	Hallazgos de <i>Acanthamoeba</i> sp	%
Úlcera corneal	13	72,2
Queratitis	1	5,6
Conjuntivitis	4	22,2

De los 79 usuarios de lentes de contacto examinados, en 14 se detectaron amibas del género *Acanthamoeba* lo que equivale al 17,7% de las muestras examinadas, en lentes y/o líquidos usados para su cuidado. Entre estos 14 usuarios de lentes de contacto donde se encontró *Acanthamoeba* sp, 10 de ellos presentaban UC, 2 tenían conjuntivitis, uno tenía prurito y ardor y uno era asintomático. De los pacientes usuarios de lentes de contacto que presentaban UC, a los cuales se les aisló *Acanthamoeba* sp, en 3 de ellos se evidenció la amiba proveniente únicamente de la lesión y solo en 2, de los lentes y líquidos usados para su cuidado (tabla 3).

Tabla 3.

Usuarios de lentes de contacto a los cuales se les encontró *Acanthamoeba* sp. Se indica el cuadro clínico y la procedencia de la muestra.

Tipo de lente	Muestra en la cual se encontró <i>Acanthamoeba</i> sp			
	Cuadro clínico	Raspado de cornea o Hisopado de párpado	Lentes	Liq. De la cajita
Blandos	Úlcera corneal	+	+	+
Blandos	Úlcera corneal	+	+	+
Blandos	Conjuntivitis	+	-	-
Blandos	Conjuntivitis	+	-	-
Blandos	Úlcera corneal	+	+	+
Blandos	Úlcera corneal	+	-	-
Blandos	Úlcera corneal	+	-	-
Blandos	Úlcera corneal	-	+	+
Blandos	Úlcera corneal	-	-	+
Blandos	Úlcera corneal	-	+	+
Blandos	Úlcera corneal	-	+	+
Blandos	Sint. Menores	-	+	+
Blandos	Asintomático	-	-	+
Duros	Úlcera corneal	+	-	-

Liq. Cajita = líquido contenido en la cajita donde se guardan los lente

Sint. Menores = ardor, picazón

De los 30 pacientes con síntomas neurológicos, se encontró *Naegleria* sp en el LCR de 2 pacientes. En ambos casos los pacientes habían tenido contacto con colecciones de agua dulce por lo menos una semana antes de comenzar los síntomas. El primer caso, un paciente de 54 años con diagnóstico de meningoencefalitis, quien una semana antes de aparecer los síntomas, se había lavado la nariz con agua de una manguera, conectada a un tanque de almacenamiento de agua en horas del mediodía. El segundo caso, una niña de 8 años quien 7 días antes se bañó en Pozo de Rosas ubicado en el Parque Henry Pittier, Estado Aragua. En ambos casos, se confirmó *Naegleria fowleri*, mediante la técnica de PCR estandarizada en el Laboratorio de Amibiasis (datos no publicados).

Se encontró un caso de *Acanthamoeba* sp al examinar una muestra obtenida a partir de un absceso cerebral en un paciente de 44 años de edad, inmunosuprimido con un adenocarcinoma metastásico de probable origen pulmonar (tabla 1). Entre los pacientes con rinitis, se observó un caso cuyo único antecedente era presentar rinitis a repetición y se evidenció trofozoítos ameboides diferentes a *Acanthamoeba* sp y *Naegleria* sp. Trofozoítos similares se encontraron en un niño con otitis.

Los resultados de acuerdo a la metodología empleada para la investigación de AVL, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4.

Métodos usados para observar las amibas de vida libre; según su procedencia.
(n = 32)

Muestra examinada	Método empleado	
	Cultivo solamente	Examen directo + Cultivo
Úlcera Corneal		3
Úlcera Corneal	10	
Queratitis	1	
Conjuntivitis	4	
LCR		2
Absceso cerebral	1	
Diarrea		2
Diarrea	1	
Exudado nasal	1	
Lentes y/o liq.		2
Lentes y/o liq.	5	

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Todas las amibas encontradas pertenecían al género *Acanthamoeba*, excepto las encontradas en el LCR, que se identificaron como *Naegleria fowleri*. líq. = líquido contenido en la cajita donde se guardan los lentes.

En las 32 muestras en las cuales se observó *Acanthamoeba* o *Naegleria*, el hallazgo en 22 de ellas, se realizó en el cultivo y en 10 por examen directo y cultivo. La comparación mediante el método de *chi cuadrado*, ($p < 0,05$) demostró que el cultivo es el mejor método para el hallazgo de AVL, resultando estadísticamente significativo.

Características morfológicas de las amibas encontradas.

Acanthamoeba: La morfología observada a partir de los cultivos se muestra en las figs (1a-1b) (vídeo 1) donde se observan trofozoitos, en los cuales se distingue la vacuola contráctil, núcleo y los acanthopodios.



Figura 1.: Trofozoitos de *Acanthamoeba* sp. en cultivo, aumento: 1000X

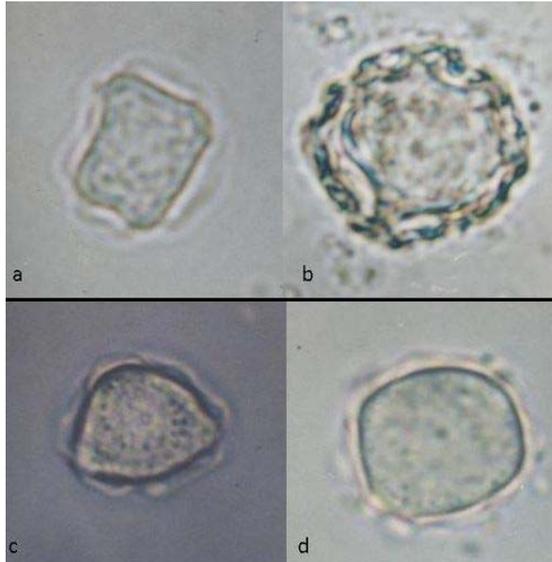


Figura 2.: a-d: quistes de *Acanthamoeba* sp. en cultivo. Aumento 1000X

Quistes en las figs (2a-d). Se observó el ectoquiste generalmente grueso y arrugado, endoquiste estrellado, poligonal, triangular, a veces redondeado, los puntos de unión entre endo y ectoquiste, se observaron en todos los aislados, en diferente plano, excepto en el aislado procedente del líquido de lavado de lente de contacto, en el cual se observaron todos los puntos, en el mismo plano. (fig 2a). A partir de los exámenes directos de diferentes muestras como absceso cerebral (Fig.3) y UC, en las cuales se observó endoquiste y el ectoquiste a menor aumento como una zona clara, y lo plegado o festoneado del mismo a mayor aumento (Fig.4).



Figura 3.: Quiste de *Acanthamoeba* sp. en cultivo obtenido de un absceso cerebral. Aumento 1000X

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

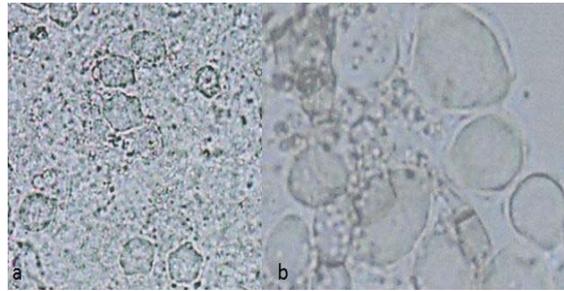


Figura 4.: Quistes de *Acanthamoeba* sp. en raspado de úlcera corneal. a = 450X , b = 1000X.

El examen microscópico directo de los lentes a menor aumento con microscopio invertido, demostró la presencia de los quistes, distinguiéndose la forma geométrica del endoquiste y su refringencia (Fig. 5) y más claramente a un aumento mayor (Fig. 6). En el líquido contenido en la cajita donde se guardan los lentes, se observó quistes aislados o combinados con el detritus observado, evidenciándose la forma del endoquiste (Fig. 7).

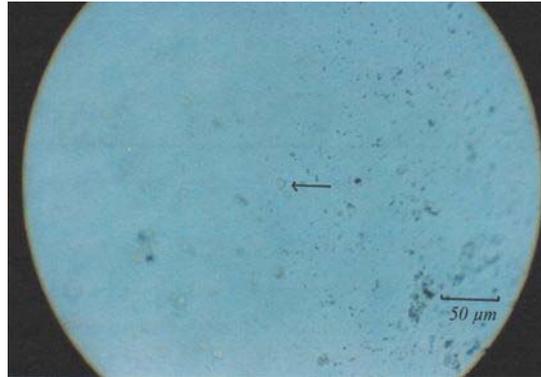


Figura 5.: Quiste de *Acanthamoeba* sp. en un lente de contacto observado al microscopio invertido. Aumento = 100X.

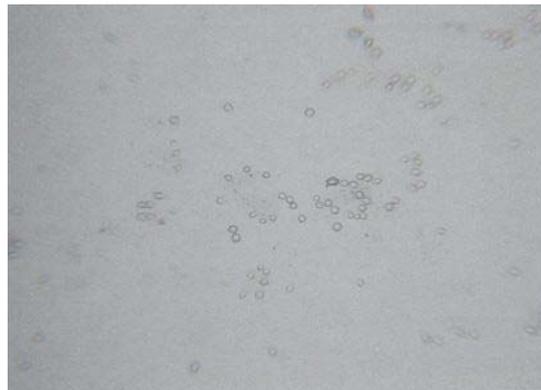


Figura 6.: Quistes de *Acanthamoeba* sp. en un lente de contacto observado al microscopio invertido. Aumento = 250X.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

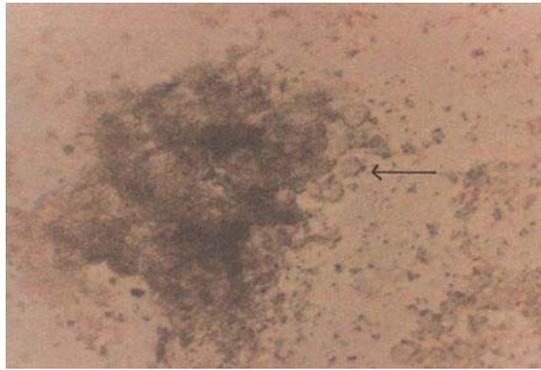


Figura 7.: Quistes de *Acanthamoeba* sp. en examen directo del líquido contenido en el recipiente para lentes de contacto. Aumento = 450X

Naegleria fowleri: A partir del LCR los trofozoítos ameboides, que midieron un promedio de 10 mm, se observaron emitiendo pseudópodos los cuales no producían un franco desplazamiento, sin evidencia de núcleo o vacuola contráctil (Fig 8).

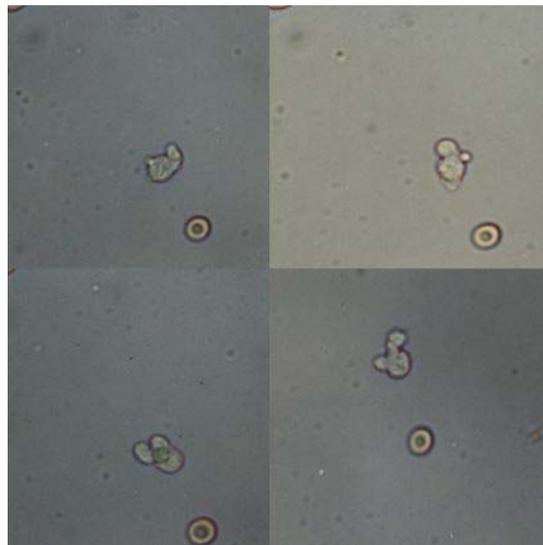


Figura 8.: Trofozoítos ameboides de *Naegleria* sp. Examen directo de líquido cefaloraquídeo, secuencia de movimientos. Aumento = 450X.

A partir de los cultivos midieron un promedio de 12 mm, se observó claramente el endoplasma y ectoplasma. Durante el movimiento, el endoplasma, parece vaciarse en el ectoplasma, evidenciándose el núcleo, que jamás pasa al ectoplasma. El núcleo presentaba un gran cariosoma, rodeado de un halo claro y una vacuola contráctil que midió 2 mm de diámetro, la cual se abría y cerraba a intervalos determinados de 2 segundos (Figs. 9-10), (Video 2).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Figura 9.: Trofozoíto ameboide de *Naegleria* sp. en cultivo. Aumento 450X.



Figura 10.: Trofozoíto ameboide de *Naegleria* sp. en cultivo. Aumento 1000X

Los quistes (Fig.11), observados a partir de los cultivos tenían un promedio de 10m m de diámetro, con un núcleo muy evidente. No se observan poros pero, después del desenquistamiento se puede ver claramente por donde salió la amiba (Fig.12).



Figura 11.: Quiste de *Naegleria* sp. en cultivo. Aumento 1000X.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Figura 12.: Pared de un quiste de *Naegleria* sp. en cultivo, con poro abierto luego del desenquistamiento. Aumento 1000X.

Los trofozoítos flagelados, fueron observados al inducir el proceso de flagelación y después de media hora de la resiembra de un medio a otro. Al colocarlos entre lámina y laminilla, pudimos ver su forma alargada, pero puede verse redondeadas, presentando dos flagelos. No se evidenció el núcleo ni la vacuola contráctil. Miden aproximadamente 10 mm (Fig.13a-13b).

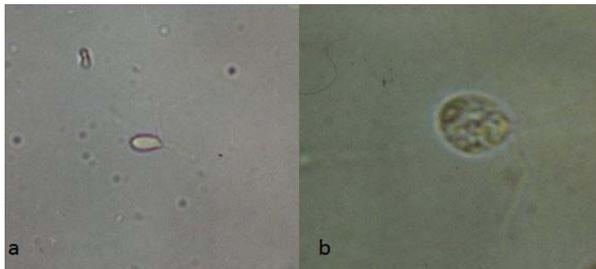


Figura 13.: Trofozoítos flagelados de *Naegleria* sp. obtenidos experimentalmente. a = 450X; b = 1000X.

Los aislados de *Naegleria*, mantenidos en cultivo, desde hace más de 10 años, continúan flagelando al proporcionar las condiciones adecuadas. Aproximadamente a partir de las cuatro horas hay flagelados, alargados y desplazándose rápidamente en el campo (Video 3), se han observado etapas de transición entre la forma ameboide y flagelada. (Fig. 14).En estos trofozoítos ameboides los flagelos desaparecen tan rápidamente que es difícil de describir el proceso en el cual desaparecen dichos flagelos, los cuales parecen ser internalizados dentro del citoplasma.



Figura 14.: Trofozoíto amebo-flagelado de *Naegleria* sp. obtenido experimentalmente. Aumento = 450X

Discusión

El hallazgo de *Acanthamoeba* o *Naegleria* en 32 casos de 530 estudiados, representa el 6,04%. Estos resultados corroboran las observaciones de diversos autores, quienes consideraron que tomando en cuenta las posibilidades de contacto que tiene el hombre con estas amibas, son pocos los casos de enfermedad producidas por ellas y las comparan con otras protozoosis de mayor impacto, tales como tripanosomiasis, toxoplasmosis y malaria, lo cual podría aparentemente les resta importancia, pero la gravedad de las enfermedades que producen, elevada mortalidad y su distribución cosmopolita, justifican su búsqueda. ^(2,4,7,15)

La metodología empleada para la investigación de AVL en pacientes con afecciones neurológicas, nos permitió encontrar *Naegleria fowleri* en 2 casos, por examen directo y cultivo del LCR y *Acanthamoeba* sp en una muestra de absceso cerebral, de un paciente con un adenocarcinoma metastático. En los tres casos el diagnóstico se realizó después de varios días de evolución de la enfermedad, a pesar de que en los casos de *Naegleria*, existían antecedentes epidemiológicos que podrían haber orientado el diagnóstico temprano. Lamentablemente el pronóstico es grave, debido a lo extenso de las lesiones ⁽⁴⁾. En los dos casos positivos a *Naegleria*, los antecedentes epidemiológicos coinciden con los reportados por Visvesvara y cols., quienes señalan que debería haber contacto prolongado y/o forzado del agua hacia la mucosa nasal ⁽⁴⁾. En el primer caso, el paciente que se lavó la nariz con una manguera que se encontraba expuesta al sol, en horas de mediodía y que estaba conectada a un tanque de agua, probablemente, las amibas estaban en el agua residual de la manguera que fueron impulsadas a presión hacia la nariz del paciente, así como en el segundo caso se trató de una escolar que nadó en un pozo de un río, donde pasó mucho tiempo en el agua con cierta

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

temperatura en horas de mediodía. El hecho de que solamente *Naegleria fowleri*, ha sido encontrada como patógena en humanos, nos permitió afirmar, que en ambos casos nos encontrábamos en presencia de dicha especie. Esto fue confirmado posteriormente mediante PCR.

La metodología empleada, permitió el hallazgo de *Acanthamoeba* sp en 14 casos de afecciones de córnea: 13 de UC y 1 de queratitis. Llama la atención que en todos los trabajos revisados, refieren que la afección corneal ocasionada por *Acanthamoeba* sp eran catalogadas como queratitis. En este trabajo el mayor hallazgo de *Acanthamoeba* sp fue en pacientes con UC y solamente se diagnosticó en 1 caso con queratitis.

En el mundo, se han reportado, aproximadamente 3.000 casos de afecciones corneales, desde 1.980 hasta aproximadamente el año 2.000 ⁽⁴⁾. Sin embargo Morlet y cols. obtuvieron que el 13% de las queratitis investigadas ⁽¹⁶⁾, son causadas por *Acanthamoeba* sp, siendo la mayoría de los pacientes usuarios de lentes de contacto, mientras que en la mayoría de los casos aquí identificados con queratitis y úlceras corneales, no lo eran. Podemos considerar que el uso de lentes de contacto, es un factor que se puede relacionar con la aparición de UC, ya que de 79 usuarios de lentes examinados (13,9%) tenían esta afección, aunque no en todas las lesiones el agente causal fue *Acanthamoeba* sp. Además, llama la atención que de los 14 hallazgos de *Acanthamoeba* sp en usuarios de lentes de contacto, 13 ocurrieron en pacientes con síntomas y solo 1 en un usuario asintomático. Podríamos pensar que de alguna manera *Acanthamoeba* podría intervenir en la presencia de esos síntomas. La búsqueda de las amibas, en los lentes de contacto y las soluciones empleadas para su cuidado, ha sido recomendada por el "Center for Disease Control and Prevention" (CDC) de Atlanta desde 1.986 y nuevamente, en el año 2007, señalan que el incremento del riesgo de keratitis por *Acanthamoeba*, es un problema de salud pública ⁽¹⁷⁾ y autores como Meisler y Rutherford y Mc Culley y cols, consideran dichos lentes como vehículo para que *Acanthamoeba* sp se introduzca en la cornea ante cualquier traumatismo ^(18,19). El hallazgo de *Acanthamoeba* sp en los lentes de contacto y/o las soluciones empleadas para su cuidado, es considerado por Walochnik y cols. como "confirmatoria" ante una UC de la cual no se aisló el protozoario ⁽¹⁰⁾, pero Froumis y cols. ⁽²⁰⁾, señalan que no necesariamente la amiba que sea aislada del lente, también lo será de la UC del usuario, y se demostró por biología molecular que pueden encontrarse especies diferentes en el lente de contacto y en la úlcera. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que en 5 casos, de pacientes con UC de origen no ambiano y en el caso del paciente que presentaba lo que llamamos síntomas menores, se identificó una amiba de los líquidos usados para el cuidado de los lentes y/o en los lentes. Compartimos la opinión de Wilhemus en que tener una de estas amibas, en el lente y/o los líquidos usados para su cuidado, establece un riesgo para el usuario, por la repetida exposición del ojo a una amiba que tenga la posibilidad de producir daño a la córnea. ⁽⁸⁾ Además, se demostró que las amibas del género *Acanthamoeba* experimentalmente, pueden producir daño a la cornea sin requerir de lesión previa ⁽²¹⁾ entonces, en los 6 casos antes mencionados, en los cuales evidenciamos amibas de este género en los lentes y/o sus líquidos, la amiba podría no ser patógena, o aún haberse dado todas las condiciones para la colonización de la cornea. Además, se requiere de ciertas condiciones, para la instalación de la amiba en el ojo, tales como largo tiempo en el uso de dichos lentes, baja higiene personal, limpieza inadecuada de los lentes, formación de una biopelícula en los lentes y se presentan una secuencia de eventos que tal vez no se habían dado en dichos usuarios, que van desde el contacto de la amiba con el ojo hasta la aparición de la lesión ⁽¹⁷⁾. Al respecto se ha establecido que la acción sobre cultivos de células epiteliales, depende de la presencia de un genotipo determinado de la amiba, en consecuencia, ameritaría realizar pruebas moleculares, para saber si la amiba encontrada pertenece a una especie patógena conocida y así conocer el riesgo para el usuario de lentes de contacto. ⁽⁸⁾ Se ha reportado frecuentemente el hallazgo de AVL en usuarios de lentes de contacto asintomáticos y que la presencia de microlesiones o el estado inmunológico del individuo, pueden ser determinantes en el curso de una infección, ya que se considera que la amiba puede penetrar por estas lesiones. Sin embargo, no debe menospreciarse el hallazgo de cualquier amiba del género *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto, debido no solamente al potencial patógeno del protozoario, sino a su capacidad de portar bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, reconocida como el principal patógeno ocular ⁽¹⁰⁾. De los pacientes con UC y usuarios de lentes de contacto, en 2 de ellos donde no se demostró *Acanthamoeba* sp, se aisló *Pseudomonas aeruginosa* de la lesión y se encontró la amiba en el líquido de lavado de los lentes, no habiéndose comprobado si esta amiba portaba la citada bacteria. En el examen microscópico de los lentes y líquido de conservación mantenido en el estuche, así como en el interrogatorio que se hizo al paciente, pudimos evidenciar que la limpieza era inadecuada, lo cual favorecía la acumulación de detritus que podrían servir de alimento a las amibas para su mantenimiento y reproducción y en consecuencia estos constituirían la fuente de infección, para la producción de lesiones oculares. Los usuarios no desinfectaban los lentes con la frecuencia debida, observación en la que coincidimos con Dini y cols. ⁽²²⁾. En el examen de los lentes al microscopio invertido, se observó una película, en la periferia del lente donde observamos detritus celulares y bacterias, la cual se ha señalado como necesaria para la transmisión de la amiba al ojo ^(17,23).

Podríamos concluir que la producción de una UC, por *Acanthamoeba* sp, por observación en nuestros pacientes y por señalamientos de otros autores, previamente citados, esta relacionada con uno o varios de los siguientes factores: trauma corneal, exposición a aguas contaminadas y asociación al uso de lentes de contacto. Entre estos últimos, el uso indebido de los lentes al dormir o nadar, la limpieza inadecuada de los lentes y los estuches donde se guardan, así como el uso de solución salina para el lavado, (que usaban algunos de nuestros primeros pacientes). Consideramos que también podría influir no desproteneizar el lente con la frecuencia requerida, ya que favorecería la permanencia de la película de detritus en el mismo. Sin embargo, en varios casos, los pacientes señalaron que sus síntomas comenzaron al usar

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

los lentes después de desproteneizarlos, a pesar de que no conseguimos amibas en estos casos. Los pacientes que presentaron UC por *Acanthamoeba* sp fueron tratados con clorhexidina-biguanida al 0,002% y/o polihexametileno-biguanida al 0,002% y consideramos que curaron. Sin embargo, sería interesante tratar de ubicarlos, para su control, ya que los nuevos reportes sobre la reactivación de posibles quistes⁽²⁴⁾, llamados quistes "durmientes", que pudieran haber quedado en el estroma y resistido a las drogas, así lo aconsejan^(3,4). Además, ninguno de los autores consultados, refieren un tratamiento como cien por ciento seguro. En 1994 reportamos el primer caso de curación en Latinoamérica.⁽²⁵⁾

El hallazgo de *Acanthamoeba* sp en los primeros dos pacientes con conjuntivitis fue casual⁽²⁶⁾ En consecuencia se decidió buscar las amibas en otros casos de esta afección. Estos resultados alertan sobre la necesidad de aumentar su búsqueda, en estas afecciones agudas y crónicas. La casuística demostró *Acanthamoeba* sp, en 2 casos con conjuntivitis aguda y en dos casos con conjuntivitis crónica.

En los 5 casos con diarrea, se observó *Acanthamoeba* sp en 3 de ellos. Al repetir las muestras a los pocos días, no se volvió a encontrar las amibas. Este resultado difiere de los reportes de Moura y cols., quienes encontraron permanencia de *Acanthamoeba* sp hasta por dos meses. Estos autores presentaron la hipótesis del posible comportamiento de esos pacientes como portadores asintomáticos⁽²⁷⁾. Llama la atención el hecho de que en el laboratorio de Amibiasis, en sus 36 años de fundado y la experiencia acumulada en el procesamiento de muestras de heces para la investigación de parasitosis intestinales, solo se haya evidenciado AVL en las heces en 5 casos. Si bien las muestras no se siembran de rutina en los medios indicados para el aislamiento de estas amibas, el hallazgo en el examen directo es una posibilidad, por lo cual suponemos que hay una frecuencia muy baja de personas que podrían ser consideradas portadoras.

En cuanto a la morfología de las amibas encontradas, tanto en *Acanthamoeba* sp, como en *Naegleria* sp la morfología y tamaño de los quistes, coincide con las características descritas^(1, 3, 4). En los de *Acanthamoeba* sp, se observó diferencias entre los quistes de un mismo aislado, tales como el número de poros y las puntas del endoquiste tal y como reportan Walochnik y cols⁽¹⁰⁾. Diferimos de la opinión de Szenási y cols.⁽²⁸⁾, quienes consideran que debe realizarse el diagnóstico diferencial con *Acanthamoeba* sp solo en aquellas infecciones oculares, que no respondan a terapia antibacteriana, antifúngica o antiviral, aunque Pearl y cols⁽²⁹⁾ señalaban que podían hacerse cultivos para encontrarlas. Con base a la experiencia sugerimos que deben investigarse estas amibas, al inicio de los síntomas y antes de empezar el tratamiento.

En cuanto al examen directo de la muestra, Schuster y Visvesvara^(3, 4), consideran que en el LCR, el trofozoito amebode, puede confundirse con macrófagos, pero en los dos casos observados las características morfológicas y el movimiento en los trofozoítos ameboides de *Naegleria* sp, no parecían macrófagos, pero si pueden confundirse con *Acanthamoeba* sp. Sin embargo a pesar de que en los dos casos de MAP, observamos amibas en el examen directo del LCR, por este solo examen, no se pudo concluir el diagnóstico.

En relación con los métodos empleados examen directo y cultivo, este último arrojó mejores resultados, existiendo diferencias significativas, entre cultivar o no. Además, como en cualquier infección microbiana, el aislamiento es importante para la identificación del agente causal y como afirman Dart y cols, "el diagnóstico definitivo requiere de cultivo"⁽³⁰⁾ y Gatti y cols afirman que "el cultivo de *Acanthamoeba* de la muestra biológica es la mejor prueba, para este organismo"⁽³¹⁾. También, el cultivo permitió aumentar el número de trofozoítos y quistes, para el estudio morfológico, su medición y descripción de las características, en forma estadísticamente significativa y realizar la prueba de flagelación, de esta manera llegamos hasta la identificación de género y fue suficiente para establecer un tratamiento, esto último según los criterios de Visvesvara⁽³²⁾.

En la metodología empleada, utilizar un medio bifásico, (agregando medio líquido a la placa con medio sólido), permite que el cultivo no se seque, durante el tiempo de incubación y elimina la necesidad de abrir la placa, para añadir líquido e impedir la deshidratación, con el consiguiente riesgo, de contaminación para el cultivo y quien lo procesa. Nos llama la atención que solo en el trabajo de Schuster⁽⁷⁾, se menciona al microscopio invertido, para observar los cultivos, siendo un método establecido en el Laboratorio de Amibiasis desde los inicios, en la búsqueda de AVL. En el resto de los trabajos consultados refieren que toman muestras para el examen entre lámina y laminilla. Con relación a las coloraciones si bien se recomienda en el caso del análisis de LCR, ya que permiten identificar las células del mismo diferenciando lo que no es amiba. La experiencia, permite compartir la observación de Pearl y cols.⁽²⁹⁾ quienes señalan la dificultad de su coloración, por lo cual en trabajos recientes no se recomienda coloraciones como método útil. Particularmente notorio, son los trabajos de Schuster y Visvesvara^(3, 4), quienes hacen una amplia revisión sobre el tema y no mencionan las coloraciones. Sin embargo en su trabajos de 1.987 en el cual hacen una amplia revisión sobre la metodología diagnóstica de AVL y el que comparte con Pearl y cols, si las recomendaban.

El diagnóstico es difícil y que pocos laboratorios están preparados para él, incluyendo la toma y transporte de la muestra^(4,7). Afirmaciones que podrían explicar el no haber encontrado registros en Venezuela, de ningún estudio sistemático de estos parásitos. Si bien la metodología que probamos y recomendamos, en este trabajo, es perfectamente confiable y reproducible, es preciso implementar en el país, técnicas de diagnóstico mas rápido, sobre todo ante la sospecha de MAP, que nos permitan que con la misma muestra de LCR, pudiéramos dar un diagnóstico, casi de inmediato, sobre todo si no encontramos resultados positivos, en la prueba de flagelación. En eso nos encontramos trabajando, actualmente en el Laboratorio de Amibiasis. En consecuencia compartimos la opinión de da Rocha y cols⁽¹¹⁾, quienes señalan que el diagnóstico temprano, depende tanto de la experiencia de quien procesara la muestra, como de la toma adecuada de la misma. Además, nuestra experiencia,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

así como la referida por otros autores, nos lleva a pensar, que el equipo de salud debe actuar más temprano ya que el paciente con MAP, se confunde en los primeros síntomas, con un fuerte resfriado y cuando el paciente acude al médico, se ha perdido un tiempo valioso. También ocurre el hecho de que se confunden los síntomas, con otras afecciones cerebrales, dejando el diagnóstico al hallazgo no pensado de las amibas en el LCR. Tendríamos que relacionar los antecedentes epidemiológicos interrogados o referidos por segundas personas, con los síntomas iniciales presentados por los pacientes. Además el hallazgo de *Acanthamoeba* sp y *Naegleria* sp en un paciente inmunocompetente con sinusitis⁽³³⁾, nos alerta sobre la posibilidad de necesidad de investigarlas en estos pacientes.

Se considera que oftalmólogos y laboratorio (en nuestro caso Bioanalistas), deben trabajar en "cerrada colaboración", para que al cultivar se logre la identificación temprana del parásito y en consecuencia, pronto tratamiento y mejor pronóstico^(22,31). Consideramos que esta colaboración también se extiende a todos aquellos médicos que puedan atender pacientes con síntomas de afecciones cerebrales compatibles con Meningoencefalitis y Encefalitis y tales como neurólogos, infectólogos, microbiólogos, parasitólogos.

Conclusiones y recomendaciones

- Los pacientes que presentaron Úlcera Corneal por *Acanthamoeba* sp fueron tratados con clorhexidina-biguanida al 0,002% y/o polihexametileno-biguanida al 0,002 % y consideramos que curaron.

- El diagnóstico de estas amibas, no debe ser un evento fortuito o consecuencia del resultado negativo de la búsqueda de otros microorganismos patógenos, ante un paciente con síntomas compatibles con Meningoencefalitis, Encefalitis o UC, se debe proceder desde el inicio a realizar el diagnóstico diferencial del agente causal, incluyendo las AVL.

- Se sugiere contribuir con campañas de concientización de los usuarios de lentes de contacto, sobre las medidas de higiene para protegerse de posibles afecciones oculares y difundir en la comunidad las medidas profilácticas para AVL, en el uso de aguas colectadas y lentes de contacto y de protección laboral, a fin de contribuir a la prevención de las enfermedades causadas por estas amibas.

- La metodología aquí descrita y los presentes resultados, permiten establecer una rutina básica, para el diagnóstico de *Naegleria* sp y *Acanthamoeba* sp en afecciones del Sistema Nervioso Central y oculares, que recomendamos a neurólogos, oftalmólogos infectólogos y sobre todo a Laboratorios de Bioanálisis. Así como las pautas para su identificación hasta género, lo cual permitirá la aplicación de un tratamiento a tiempo mientras se desarrolla en el país otra metodología que cumpla con ese fin.

- Médicos, Bioanalistas y Parasitólogos, deben trabajar en "estrecha colaboración", para que con el cultivo se logre la identificación temprana del parásito y en consecuencia, el temprano tratamiento y mejor pronóstico.

- Los laboratorios de Bioanálisis, deben conocer a tiempo la información epidemiológica que permita orientar el diagnóstico, para actuar rápidamente, hecho imprescindible sobre todo en el caso de *Naegleria fowleri*, debido a la velocidad con que progresa la enfermedad producida por estas amibas.

-La metodología que probamos y recomendamos, en este trabajo, es confiable y reproducible. No obstante es preciso implementar en el país, técnicas de diagnóstico mas rápido, sobre todo ante la sospecha de MAP, que nos permitan que con la misma muestra de LCR, pudiéramos dar un diagnóstico, inmediato, sobre todo cuando la prueba de flagelación es negativa.

- El hallazgo de AVL, especialmente *Acanthamoeba* sp, en exudado nasal de portadores asintomáticos, indica la importancia de su búsqueda en ellos y su observación en el tiempo.

- Es recomendable estudiar los aislados de *Acanthamoeba* sp, para determinar los posibles microorganismos que puedan tener en un proceso de endosimbiosis, por la posibilidad de ser vectores de microorganismos patógenos.

Apéndice (videos)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Acanthamoeba**Naegleria 40X****Naegleria flagelado. 40X****Referencias**

- 1- Page FC. Taxonomic Criteria for Limax Amoebae with description of 3 New Species of *Hartmanella* and 3 of *Vahlkampfia*. J Protozool. 1967; 14:499-521.
- 2- Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of Free-Living Amoebae. Crit Rev in Microbiol. 1994;

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

20:225-41.

3- Schuster FL, Visvesvara G.S. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol* 2004; 126:91-120.

4- Schuster FL, Visvesvara GS. Free living amoebae as opportunistic and non pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 2004; 34:1001-27.

5- Singh BN. Possible phylogenetic classification of Order *Amoebidae*. In: Pathogenic and non-pathogenic Amoebae The Macmillan Press LTD, editors. Londres: 1.975; 1-100.

6- Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:342-54.

7-Schuster FL, Visvesvara GS Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat*. 2004; 7: 41-51.

8- Wilhemus K. Increasing Importance of *Acanthamoeba*. *Arch Ophthalmol*. 1991;13:S367-8

9- Axelsson-Olsson D, Waldenström J, Broman T, Olsen B, Holmberg M. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a Potencial Reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:987-92.

10- Walochnik J, Sommer K, Obwaller E, Haller-Schober M, Aspöck H. Characterization and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. *Parasitol Res*. 2004; 92:289-98.

11- da Rocha-Azevedo B, Tanowitz H., Marciano-Cabral F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis*.2009;251406.

12- Rondanelli E.G, Scaglia M. Pathogenic Amphizoic Amoebae (*Naegleria fowleri-Acanthamoeba*) sp. Morphology and Cytology. In: Rondanelli EG, editors. Amphizoic Amoebae Human Pathology. 1ed. Padua; Piccin Nuova Libreria; 1987.49-55.22-

13- Culbertson CG, Ensminger PW, Overton WM. Pathogenic *Naegleria* sp. Study of a Strain Isolated from Human Cerebrospinal Fluid. *J Protozool*. 1968;15:353-63.

14- Chinchilla M, Castro E, Alfaro M, Portilla E. Amebas de Vida Libre productoras de Meningoencefalitis. Primeros Hallazgos en Costa Rica. *Rev Latinoam Microbiol*. 1979; 21:135-42.

15- Marciano-Cabral F, Puffenbarger R, Cabral G. The Increasing Importante of *Acanthamoeba* Infections. *J Eukaryot Microbiol*. 2000;47:29-36.

16- Morlet N, Duguid G, Radford C, Matheson M, Dart J. Incidence of *Acanthamoeba* keratitis whit contac lens wear. *Lancet* 1997; 350:414.

17- Rugaiyyah S., Naveed AK. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012; 5-6

18- Meisler D, Rutheford I. *Acanthamoeba* and Desinfection of Soft Contac Lenses. *Rev Infec Dis*. 1991; 13:390-2.

19- Mc Culley JP, Alizadeh H, Niederkon JY. The diagnosis and management of *Acanthamoeba* keratitis. *Clao J*. 2000; 26:47-51.

20- Froumis N, Mondino BJ, Glasgow BJ. *Acanthamoeba* Keratitis Associated with Fungal Keratitis. *Am J Opthamology*. 2001; 131:508-9.

21- Omaña-Molina M, Gonzalez -Robles A, Salazar-Villatoro LI, Cristobal -Ramos AR, González-Lazaro M, Salinas-Moreno E, Mendez-Cruz R, Sanchez-Correojo M, De la Torre González E, Martínez-Palomo A. *Acanthamoeba castellanii*: morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp. Parasitol*.2010;126:73-8

22- Dini LA, Cockinos C, Frea JA, Nizzi IA, Markus M.B. Inusual Case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in a Contact Lens Wearer from Gauteng, South Africa. *J Clin Microbiol*. 2000; 826-9.

23- Dudley R, Matin A, Alsam S, Sissons J, Mashsood AH, Khan NA. *Acanthamoeba* isolates belonging to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Trop*. 2005;2:100-8.

24- Panjwani N. Patogénesis of *Acanthamoeba* Keratitis. *Ocul Surf*. 2010;70-9

25- Bermúdez A, Díaz O, Pérez de Galindo MV, Pérez de Suarez S. *Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas. *An Inst Barraquer (Barc)*.1994; 94-8.

26- Bermúdez A, Pérez de Galindo MV, Martínez Y, Pérez de Suárez E, Nieto T. Identificación de *Acanthamoeba* sp en tres pacientes con conjuntivitis. *An Inst Barraquer (Barc)*.1998; 27:157-63.

27- Moura H, Salazar H, Fernandez O, Costa L, Carvalho F. Amebas de vida libre en intestino humano: evidencias de parasitismo. *Rev. Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985; 27:150-6.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

- 28- Szénási S, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of free-living amoebae causing human disease. *J Med Microbiol.* 1998; 47:5-16.
- 29- Pearl M, Visvesvara GS, Martínez AJ, Theodore F, Daggett PM, Sawyer T. *Naegleria* and *Acanthamoeba* Infections. *Rev Infec Dis.* 1990; 12: 490-513.
- 30- Dart JK, Saw VP, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol.* 2009; 487-934 32- Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, Bruno A, Maserati R, Di Cave D. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol.* 2010; 59:1324-30
- 31- Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, Bruno A, Maserati R, Di Cave D. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol.* 2010; 59:1324-30
- 32- Visvesvara GS. Free Living Amoebae. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Lennette, EH Balows, Hausler WJ, Truant JP.3 ed. Washington D.C. Am Soc Microbiology. 1980. 704-8.
- 33- Sukthana Y, Rigunti M, Siripanth C, Kusolsuk T, Chintrakarn C, Kulpaditharom B. An exotic sinusitis. *Trans Soc Trop Med Hyg.* 2005; 99:555-7.

NOTA: Toda la información que se brinda en este artículo es de carácter investigativo y con fines académicos y de actualización para estudiantes y profesionales de la salud. En ningún caso es de carácter general ni sustituye el asesoramiento de un médico. Ante cualquier duda que pueda tener sobre su estado de salud, consulte con su médico o especialista.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Evaluación de la actividad biológica de los extractos hexanólico (Eh) y metanólico (Em) de *Pera distichophylla* sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp. proveniente de una úlcera corneal

DORTA A.¹, WAGNER C. M.¹, PÉREZ DE G. M. V.¹, BLANCO DE M. J.², GALINDO M. V.¹, NESSI A.¹, VETHENCOURT M. A., BANDES A.¹ y GUZMÁN DE R. C. T.¹

- ¹ Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela. E-mail: bioparas@ucv.ve, angelyseb@gmail.com
² Grupo de Productos Naturales, Escuela de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITY OF HEXANOLIC (EH) AND METHANOLIC (EM) EXTRACTS FROM *PERA DISTICHOPHYLLA* AGAINST AN *ACANTHAMOEBA* SPP. ISOLATE OBTAINED FROM A CORNEAL ULCER

Recently, infections due to *Acanthamoeba* genus have increased, specially ocular affections and pharmacological treatment for them has some limitations. Searching for effective alternatives against this protozoan, we decided to evaluate natural products obtained from plants, having previous reports of amoebicidal activity of some extracts against different species of *Acanthamoeba*. We evaluated *in vitro* biological activity of hexanolic (Eh) and methanolic (Em) extract, obtained from *Pera distichophylla*, an amazonic plant, against an *Acanthamoeba* spp. (A27) strain, isolated from a patient suffering a corneal ulcer. Trophozoites of isolate A27 exposed to different Eh concentrations presented morphological changes, probably caused by the effect of DMSO as solvent extract, while morphological changes observed after contact with Em seemed to be caused by 0.75 mg/ml Em concentration and not by the DMSO; no changes were observed in the cysts. The 0.75 mg/ml Eh concentration apparently decreased the proliferation of *Acanthamoeba* spp. and Em produced lysis. Viability tests not yielded important changes. Finally, we recommend evaluating these extracts on other *Acanthamoeba* spp. isolates, to determine whether these effects are isolate-dependent; performing cytotoxicity tests on corneal cells and *in vivo* studies in experimental animals, which would provide more information about its activity and prophylactic potential or therapeutic use.

Key words: *Acanthamoeba* spp., corneal ulcer, natural extracts, *Pera distichophylla*.

Recibido: 15 de Junio de 2011. Aceptado: 15 de Mayo de 2012.

Correspondencia: Carolina M. Wagner. Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela.
E-mail: bioparas@ucv.ve, angelyseb@gmail.com

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

RESUMEN

En los últimos años, las infecciones por *Acanthamoeba* spp. se han incrementado, especialmente las oculares y el tratamiento farmacológico utilizado tiene ciertas limitaciones. En la búsqueda de alternativas para un tratamiento efectivo contra este protozoario, surgió la inquietud de evaluar productos naturales provenientes de plantas, ya que se ha reportado la existencia de actividad amebicida de algunos extractos sobre diferentes especies de *Acanthamoeba*. Se planteó una evaluación *in vitro* de la actividad biológica de los extractos hexanólico (Eh) y metanólico (Em) obtenidos de *Pera distichophylla*, una planta del Amazonas, sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp. (A27), proveniente de una paciente con úlcera corneal. Los trofozoitos del aislado A27 expuestos a las diferentes concentraciones del Eh presentaron modificaciones morfológicas, probablemente originadas por el efecto del DMSO como solvente del extracto, mientras que los cambios morfológicos observados después del contacto con el Em sí parecen ser ocasionados por la concentración de 0,75 mg/ml y no por el DMSO; en los quistes no se observó ninguna modificación. El Eh a la concentración de 0,75 mg/ml, aparentemente disminuyó la proliferación de *Acanthamoeba* spp. y el Em, produjo lisis. Los ensayos de viabilidad no arrojaron cambios importantes. Finalmente, se recomienda evaluar estos extractos sobre otros aislados de *Acanthamoeba* spp., para determinar si estos efectos son aislado-dependientes, realizar ensayos de citotoxicidad sobre células corneales y ensayos *in vivo* en animales de experimentación, lo cual permitiría obtener mayor información sobre su actividad y posible uso profiláctico y/o terapéutico.

Palabras clave: *Acanthamoeba* spp., úlcera corneal, extractos naturales, *Pera distichophylla*.

INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoarios descritos como parásitos facultativos y patógenos oportunistas (Page, 1974; Shuster y Wisvesvara, 2004). Entre las AVL que pueden afectar al hombre se encuentran las del género *Acanthamoeba* spp., que son las más ampliamente distribuidas en la naturaleza (Page, 1988). En el ojo, pueden ocasionar queratitis y úlceras corneales, afectando la visión en distintos grados y aunque la queratitis por *Acanthamoeba* spp. es poco común, se considera una infección de la córnea potencialmente grave. Desde 1980 hasta el año 2000, se han reportado un aproximado de 3.000 casos de queratitis por *Acanthamoeba* (Shuster y Wisvesvara, 2004; Jersic, 2007) afectando a individuos de cualquier edad, pero es más común en adultos jóvenes, usualmente con buen estado de salud e inmunocompetentes (Shuster y Wisvesvara, 2004; Ishibashi, 1997). Estudios recientes sugieren un estimado de 1,2 adultos por millón por año para infecciones severas por este género (Mathers, 2004), relacionados en su mayoría con el uso de lentes de contacto (Pérez de Galindo, 1995; Oddó, 2006; Jersic, 2007), con una incidencia entre 0,2 y 0,3 por cada 10.000 usuarios

de lentes de contacto por año (Seal, 2003; Mathers, 2004). En Venezuela, no se conoce bien la frecuencia de las infecciones oftalmológicas ocasionadas por *Acanthamoeba* spp., existiendo sólo algunos reportes (Pérez de Galindo, 2005).

A pesar de los avances en el tratamiento de las queratitis producidas por *Acanthamoeba* spp., continúan ocurriendo fallas terapéuticas, necesitando intensificar y prolongar la terapia médica, realizar intervenciones quirúrgicas y enfrentarse a la posible pérdida permanente de la visión o la enucleación del ojo (Seal, 2003; Van der Vijl, *et al.*, 2004). El uso de plantas para el tratamiento de diferentes especies de *Acanthamoeba* spp. ha sido objeto de varias investigaciones (Chu *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1999; Vural *et al.*, 2007; Polat *et al.*, 2007; ayb, 2008). Venezuela posee en el Amazonas, una gran diversidad de especies vegetales, muchas de ellas con propiedades curativas; *Pera* spp. es un género botánico perteneciente a la familia Euphorbiaceae (Luna, 2003), dentro del cual, muchas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional para la cura de enfermedades. Las quinonas han sido los compuestos aislados de este género con mayor actividad biológica (Rodríguez *et al.*, 2006). *Pera distichophylla* se ubica en bosques de tierra

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

firme bajos y bosques inundables de arenas blancas entre 50 y 250 mts sobre el nivel del mar. En Venezuela se encuentra limitada sólo a los estados Bolívar y Amazonas (Luna, 2003, Morales y Castillo, 2005). Utilizando hojas de la planta *P. distichophylla*, para su análisis fitoquímico y biológico, se demostró que el extracto crudo alcohólico (Ec) posee actividad antiparasitaria sobre *Trypanosoma cruzi* y antiviral sobre el virus del dengue (Luna, 2003). Estos ensayos fueron ampliados por Rodríguez-Ortega *et al.*, (2006), al evaluar los extractos acuosos (Ea) y alcohólicos (Ec) de *P. glabrata* y de *P. distichophylla* para su actividad anti-parasitaria sobre *T. cruzi* y antiviral sobre los virus del dengue y de la fiebre amarilla. El Ec de *P. distichophylla* también fue evaluado *in vitro* sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp., causante de patología ocular, observándose inhibición del crecimiento del aislado a una concentración de 10 mg/ml, probablemente debido a inhibición del desenquistamiento y/o lisis de los quistes y/o trofozoítos, además de producir redondeamiento y vacuolización de los trofozoítos como señal de daño celular (Salazar, 2004).

Es por ello que, al disponer de extractos obtenidos de *P. distichophylla*, y conociendo los antecedentes de su actividad contra *Acanthamoeba* spp. y otros protozoarios como la familia *Trypanosomatidae* (Rodríguez *et al.*, 2006), se justificó la evaluación de los efectos de los extractos hexanólico (Eh) y metanólico (Em) obtenidos de *P. distichophylla* sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp. proveniente de una úlcera corneal humana para así conocer posibles alternativas terapéuticas que permitan alcanzar la mejoría y/o curación de las enfermedades producidas por este protozoario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extractos naturales: Los extractos fueron obtenidos a partir de la planta *P. distichophylla*, en el estado Amazonas, Venezuela. El procesamiento y obtención de Eh y Em, fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV) (Luna, 2003).

Se prepararon dos (2) soluciones de trabajo de Eh para ser evaluadas: 0,75 mg/ml y 3,8 mg/ml, a partir de una solución madre de 23 mg/ml en

dimetilsulfóxido (DMSO) al 16% como solvente. Al realizar las diluciones, cada solución de trabajo quedó con una concentración de DMSO al 0,7% y 3,5% respectivamente. Para el Em, se prepararon igualmente dos (2) soluciones de trabajo: 0,75 mg/ml y 3,8 mg/ml, a partir de una solución madre de 40,3 mg/ml en DMSO al 16% como solvente. Al realizar las diluciones, cada solución de trabajo quedó con una concentración de DMSO al 0,3% y 1,5% respectivamente. Se consideró los porcentajes de DMSO en los cuales quedó cada solución de trabajo, a los efectos de establecer los controles del solvente respectivo en cada ensayo.

Aislado de *Acanthamoeba* spp. mantenido en medio de Page modificado): El aislado de *Acanthamoeba* spp. fue obtenido por raspado de una úlcera corneal en una paciente de 27 años de edad, usuaria de lentes de contacto. El aislado, denominado como A27 según nomenclatura propia del Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina-U.C.V, ha sido mantenido en el medio de cultivo bifásico de Page modificado por Chinchilla *et al.*, (1979), en placas de petri y adaptado al crecimiento en placas de poliestireno de 24 pozos con el mismo medio para realizar los bioensayos. Se preparó una suspensión de trofozoítos y quistes de concentración conocida, para ser utilizada en los diferentes bioensayos.

Ensayos para la evaluación del efecto de Eh y Em de *P. distichophylla* sobre el aislado A27 de *Acanthamoeba* spp: El efecto de las distintas concentraciones de Eh y Em sobre los trofozoítos y quistes del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. fue evaluado en cultivos en placas de poliestireno de 24 pozos (Nunc®). Se agregó 0,5 ml de las soluciones madres de cada extracto a estudiar o el DMSO respectivo, como control. A todos los pozos se agregó, aproximadamente 0,1 ml de suspensión de *Escherichia coli* y 0,5 ml de la suspensión de amibas ($65,5 \times 10^3$ amibas/ml) y se completó hasta un volumen final de 2 ml con medio líquido. Al diluir las respectivas soluciones madres de Eh y Em con la suspensión de amibas y la suspensión de *E. coli*, las concentraciones de ambos extractos quedaron a 0,75% y 3,8% mg/ml.

Los controles empleados fueron: a.- Control de amibas más bacterias; b.-Control de DMSO al 0,7% y 3,5% para Eh y al 0,3% y 1,5% para el extracto Em. Para ambos extractos los experimentos

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

se realizaron por duplicado. Los trofozoítos y quistes se incubaron con los extractos a 37°C, evaluando el efecto de cada concentración y de los controles sobre las amibas a diferentes tiempos de exposición: 2, 24, 48, 72 y 96 horas. Al concluir cada tiempo, se recolectó el contenido de cada pozo, midió el volumen obtenido, realizó el recuento final de las amibas y se observó la morfología. Posteriormente, se realizó un lavado con medio de cultivo líquido, posterior centrifugación a 150 g y descarte del sobrenadante, para detener el efecto de los extractos y del DMSO en el caso de los controles respectivos. El sedimento obtenido fue resuspendido en medio líquido y se evaluó el efecto de los extractos en los quistes y trofozoítos sobre su viabilidad y el crecimiento en cultivo en medio de Page modificado por Chinchilla y col. (1979) en placas de petri. Los bioensayos realizados se describen a continuación:

1.- Evaluación del efecto de Eh y Em de *P. distichophylla* sobre la morfología del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp.

La morfometría del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. fue evaluada antes y después del contacto con los extractos, mediante examen al fresco con objetivo de 40X. Para determinar el posible efecto sobre el aislado, se tomaron en consideración los siguientes parámetros: a) Para los trofozoítos, redondeamiento, variaciones del tamaño, vacuolización del citoplasma y variaciones del tamaño de la vacuola contráctil, b) para los quistes, igualmente se consideró cambios de forma y/o tamaño de los mismos.

2.- Evaluación del efecto de Eh y Em de *P. distichophylla* sobre el número de trofozoítos y quistes del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. Determinación de la capacidad lítica.

La evaluación de la capacidad lítica se realizó mediante el recuento de amibas antes y después del contacto con los extractos. Al concluir cada tiempo de incubación, se recogió el volumen de cada pozo por separado y se colocó una gota de la suspensión en cámara de Neubauer para realizar el recuento final de las amibas por duplicado. El porcentaje de lisis se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de amibas (T y Q) iniciales} - \text{N}^\circ \text{ de amibas (T y Q) finales}}{\text{N}^\circ \text{ de amibas (T y Q) iniciales}} \times 100$$

Para comparar los resultados del porcentaje (%) de lisis obtenido al emplear esta metodología, con los reportes de lisis celular producidos por extractos naturales sobre células (epitelio corneal) descrito por otros autores (Polat *et al.*, 2007^a), se hizo una transformación de los mismos a la siguiente escala numérica: 0= lisis no detectable (0%); 1 = menos de 20% de lisis; 2 = 20-40% de lisis; 3 = > 40 a < 60% de lisis; 4 = > 60 a < 80% de lisis; 5 > de 80% de lisis.

3.- Evaluación del efecto de Eh y Em de *P. distichophylla* sobre la viabilidad del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. mediante el método de exclusión de colorantes: azul de tripano.

Al concluir los tiempos de incubación de las amibas con los extractos, se recolectó el contenido de cada pozo, se lavó y se obtuvo el sedimento después de centrifugar. Se colocó una gota del mismo con una gota del colorante supravital azul de tripano, se observó al microscopio y determinó el porcentaje de amibas vivas y muertas. Como controles de la prueba, se examinó amibas sin tratamiento y amibas muertas por calor o con lugol, con el azul de tripano. Se contaron las amibas en cada preparación, por duplicado. Se consideraron como amibas vivas, los trofozoítos y quistes que no tomaron el colorante, y lo contrario en el caso de las amibas muertas. Se estimó el % de viabilidad según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de amibas vivas}}{\text{Total de amibas contadas}} \times 100$$

4.- Crecimiento del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. en el medio de Page modificado por Chinchilla y col. (1979), luego de diferentes tiempos de exposición a Eh y Em de *P. distichophylla*.

Una alícuota (no cuantificada) de las amibas expuestas a los extractos y al DMSO fue sembrada en el medio de Page modificado por Chinchilla *et al.*, (1979), en placas de petri, e incubadas a 37°C. La placa de cultivo fue examinada mediante microscopio invertido con objetivo de 25X, a las 2 horas y a los 7 días y se estimó semicuantitativamente la cantidad de amibas presentes

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	914115	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

en los campos observados. El inóculo sembrado en cada placa fue variable, ya que estuvo constituido por las amibas recolectadas después de la acción de cada extracto y control de DMSO respectivo. Se determinó si hubo crecimiento al comparar la observación realizada a las 2 horas respecto a la observación de los 7 días.

Análisis estadístico: Los datos obtenidos de los experimentos para evaluar el efecto de ambos extractos sobre el número de amibas, se agruparon en tablas de contingencia, para ser analizados posteriormente mediante la prueba de chi-cuadrado, usando el programa GraphPad Instad 3.02 (software GraphPad, San Diego, c.a). Los valores de los resultados se consideraron significativos, si $p < 0,05$, para 1 grado de libertad.

RESULTADOS

1.- Morfología del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp.: El aislado A27 de *Acanthamoeba* spp., antes de ser expuesto a las diferentes concentraciones de los extractos, presentó las siguientes características al microscopio óptico: a) Trofozoítos: forma irregular, con una medida promedio de 26μ de diámetro mayor; emisión de filopodios (acanto-

podios). Endoplasma granular, 1 ó 2 vacuolas contráctiles con un diámetro promedio de 4μ y algunas vacuolas digestivas (Figura 1-A). b) Quistes: con doble pared quística, exoquiste ligeramente ondulado y endoquiste irregular o poliédrico con varias puntas; diámetro promedio de 14μ . El citoplasma se observó finamente granuloso y el núcleo no fue evidenciado en el examen al fresco (Figura 1-B).

En los trofozoítos, la exposición al Eh y sus controles de DMSO a diferentes tiempos, sólo produjo cambios en la forma, observándose redondeamiento celular, con un diámetro promedio de 20μ , vacuolas degenerativas de aproximadamente $12,5 \mu$ y numerosos gránulos intracitoplasmáticos (Figura 2). Estas modificaciones fueron evidentes a partir de las 48 horas, presentándose en los controles de DMSO, mientras que a las 72 horas, los cambios mencionados se observaron tanto en los controles de DMSO como en las concentraciones del Eh. Cabe destacar que, a las 96 horas no hubo modificaciones de la morfología de los trofozoítos, en ninguno de los controles ni de las concentraciones del extracto Eh.

Luego de la exposición del aislado A27 a las concentraciones de DMSO y del extracto Em, tampoco se evidenciaron cambios morfológicos en los quistes, sólo en la forma vegetativa, los cuales

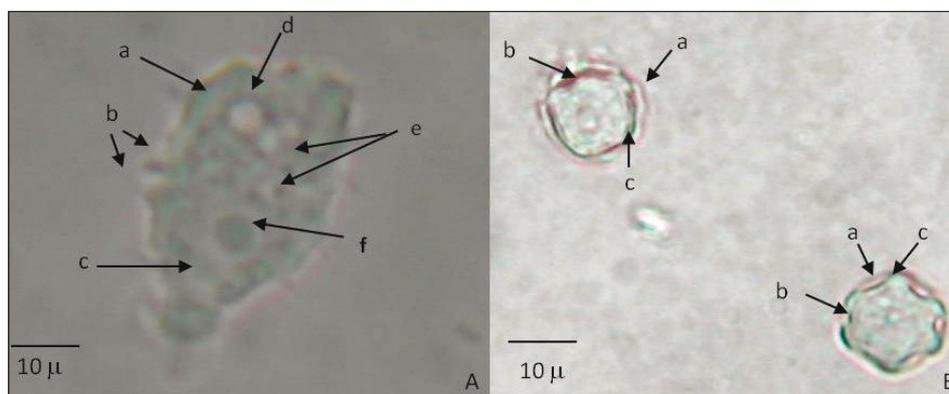


Figura 1. A: Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp., aislado A27, antes de la exposición a los extractos Eh y Em de *Pera distichophylla*. Examen directo en medio líquido de Page modificado, 1.000 aumentos. Se observa el ectoplasma (a) con escasos acantopodios (b) y endoplasma (c) Vacuola contráctil (d) y digestivas (e) Núcleo con cariosoma evidente (f). B: Quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27, antes de la exposición a los extractos Eh y Em de *Pera distichophylla*. Examen directo en medio líquido de Page modificado, 1.000 aumentos. arriba: quiste con 6 puntas. Se observan dos quistes de *Acanthamoeba* spp., donde se evidencia ecto (a) y endoquiste (b), con poro u ostiolo (c).

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

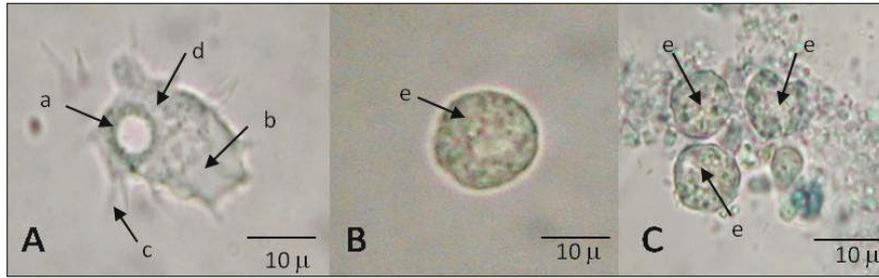


Figura 2. Trofozoitos de *Acanthamoeba* spp., aislado A27, luego de la exposición al extracto Eh *Pera distichophylla*. (Examen directo en medio líquido de Page modif. 1.000 aumentos). A: trofozoito en DMSO 3,5% a las 48 horas de incubación, con vacuola degenerativa (a), ectoplasma hialino (b) con numerosos acantopodios (c) y endoplasma granuloso y vacuolado (d), B: trofozoito en DMSO 3,5% a las 48 horas de incubación, redondeado sin acantopodios, con gránulos (e), C: se observan 3 trofozoitos vivos redondeados, vacuolados y con gránulos, expuestos al Eh 3,8 mg/ml a las 72 horas (Examen directo con colorante supravital Azul de Tripiano, 1.000 aumentos).

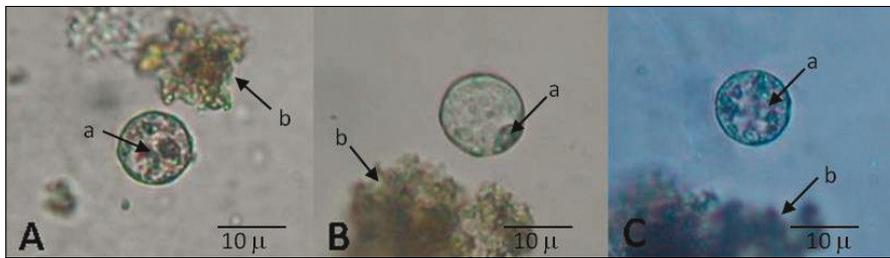


Figura 3. Trofozoitos de *Acanthamoeba* spp., aislado A27, luego de la exposición al extracto Em *Pera distichophylla*. A: trofozoito en Em 3,8% a las 48 horas de incubación (Examen directo en medio líquido de Page modificado. 1.000 aumentos), redondeado y vacuolado, con gránulos en endoplasma (a), B: trofozoito vivo redondeado, con gránulos finos (a). C: trofozoito muerto, redondeado y vacuolado, con gránulos endoplásmicos (a). B y C: trofozoitos expuestos al Em 3,8 mg/ml a las 96 horas (Examen directo con colorante supravital Azul de Tripiano, 1.000 aumentos). Los trofozoitos en A, B y C se observan rodeados de material granuloso (b), proveniente del extracto Em.

fueron semejantes a los descritos para el Eh (Figura 3). Estos cambios se presentaron a las 24 horas para el DMSO 1,5% y Em 0,75 mg/ml. A las 48 y 72 horas, las modificaciones también fueron evidentes en el aislado expuesto al Em 3,8%, manteniéndose las mismas hasta las 96 horas de exposición, a diferencia de lo que ocurre al aislado expuesto al Em 0,75 mg/ml, que no presenta alteraciones en su morfología.

2.- Efecto del Eh y Em de *P. distichophylla* sobre el número de amibas (trofozoitos y quistes) del Aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. Evaluación de la capacidad lítica: Antes de la evaluación de los extractos a las diferentes concentraciones

se realizó una curva de crecimiento del parásito en cultivos en placas de poliestireno 24 pozos. Al realizar los recuentos del número de amibas durante las distintas horas de duración del experimento, se obtuvo que, a las 2 horas de haber colocado el inóculo inicial, ocurrió una disminución en el número de amibas, que se prolongó hasta la 24 horas. A partir de este tiempo, y hasta las 72 horas, hubo un aumento en el número de amibas, el cual decreció a las 96 horas de observación, por lo cual, se consideró las 24 horas como el tiempo inicial y por ende, el recuento basal de cada ensayo.

2.1.- Efecto del Eh y Em *P. distichophylla* sobre el número de trofozoitos y quistes. Evaluación de la capacidad lítica.

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

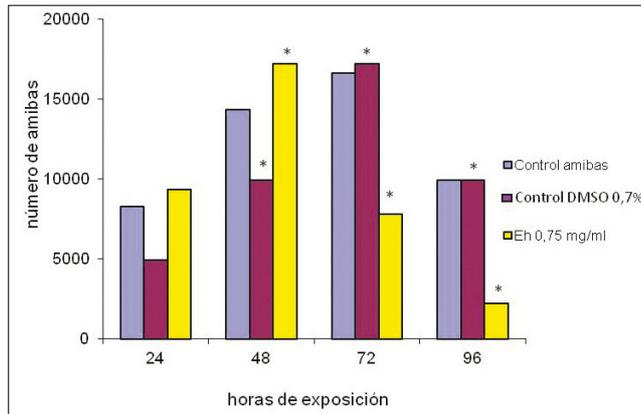


Figura 4. Efecto del extracto Eh de *Pera distichophylla* 0,75 mg/ml y del control de DMSO 0,7% sobre los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27. (*: $p < 0,05$).

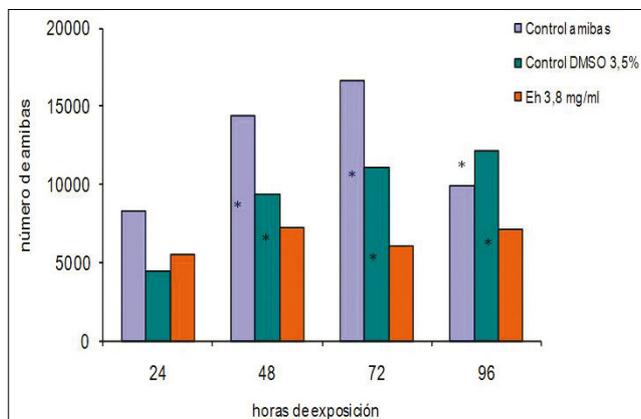


Figura 5. Efecto del extracto Eh de *Pera distichophylla* 3,8 mg/ml y del control de DMSO 3,5% sobre los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27. (*: $p < 0,05$).

En la Figura 4, se observa el crecimiento de *Acanthamoeba* spp., aislado A27 a diferentes tiempos de exposición con el Eh de *P. distichophylla* y los respectivos controles. Al comparar con el recuento basal de amibas, se observa que en presencia de DMSO 0,7%, hay un aumento en el número de amibas a las 48, 72 y 96 horas, con diferencia significativa en todos los tiempos ($p < 0,05$). En contacto con el Eh 0,75 mg/ml, hay un aumento a las 48 horas y una disminución para las 72 y 96 horas, con diferencia significativa en ambos casos ($p < 0,05$). Tanto el control de amibas como las que estuvieron en contacto con el DMSO 0,7%, alcanzaron un pico máximo de crecimiento a las 72 horas. Sin embargo, las amibas en DMSO 0,7% crecieron

más lentamente que el control de amibas antes de llegar al pico máximo de crecimiento. En presencia del extracto Eh 0,75% mg/ml, el pico máximo ocurrió a las 48 horas, es decir, antes que el control de amibas y el aislado en presencia del DMSO 0,7%, decreciendo rápidamente en las siguientes horas.

La evaluación del crecimiento de las amibas expuestas al DMSO 3,5%, reflejó un aumento del número de trofozoítos y quistes a las 48, 72 y 96 horas de exposición, al compararse con el recuento base, con diferencias significativas en todos los tiempos observados (Figura 5). En relación con el aislado A27 expuesto al Eh 3,8 mg/ml, el parásito mostró un aumento discreto en su número, con significancia estadística en todas las horas de

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Tabla 1. Capacidad lítica del extracto Eh de *Pera distichophylla* y de los controles de DMSO, sobre los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27

Tiempo de exposición/ Concentración	48 horas	72 horas	96 horas
Control DMSO 0,7%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Control DMSO 3,5%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Eh 0,75 mg/ml	0 (0%)	1 (16,60%)	4 (76,47%)
Eh 3,8 mg/ml	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

0= lisis no detectable (0%); 1= menos de 20% de lisis; 2=20-40% de lisis; 3= >40 a <60% de lisis; 4= >60 a <80% de lisis; 5= más de 80% de lisis¹⁵

Tabla 2. Capacidad lítica del extracto Eh de *Pera distichophylla* y de los controles de DMSO, sobre los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27

Tiempo de exposición/ Concentración	48 horas	72 horas	96 horas
Control DMSO 0,3%	3 (43,3%)	2 (24,5%)	0 (0%)
Control DMSO 3,5%	5 (83,3%)	3 (41,7%)	0 (0%)
Eh 0,75 mg/ml	1 (11,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Eh 3,8 mg/ml	1 (16,7%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)

0= lisis no detectable (0%); 1= menos de 20% de lisis; 2=20-40% de lisis; 3= >40 a <60% de lisis; 4= >60 a <80% de lisis; 5= más de 80% de lisis¹⁵

incubación ($p < 0,05$). Al comparar el crecimiento del aislado sometido al DMSO 3,5% con el control de amibas, se observó un crecimiento continuo y progresivo hasta las 96 horas, sin mostrar un pico máximo. En presencia del Eh 3,8 mg/ml, el número de amibas del aislado A27 no varió marcadamente en el tiempo.

En la Tabla 1, se muestra el cálculo de la capacidad lítica de las diferentes concentraciones del Eh y de DMSO. El control DMSO no demostró capacidad lítica en ninguna de las concentraciones ensayadas. El Eh sólo mostró efecto lítico sobre el aislado, a la concentración de 0,75 mg/ml, siendo de 16,60% para la 72 horas y una lisis mayor (76,47%) a las 96 horas de observación.

2.2.- Efecto del Em de *P. distichophylla* sobre el número de trofozoítos y quistes del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. Evaluación de la capacidad lítica.

La Figura 6 representa el efecto del control de DMSO 0,3% y del Em 0,75 mg/ml. En presencia del control de DMSO 0,3%, aumentó el número de amibas a las 96 horas, al compararlo con el

recuento basal ($p < 0,05$). Cuando se expusieron los trofozoítos y quistes al Em 0,75 mg/ml, hubo disminución del número de parásitos en ambos casos (48 y 72 horas), la cual se modificó a las 96 horas al aumentar el número de amibas ($p < 0,05$). Cuando se compara el crecimiento de las amibas expuestas tanto al control de DMSO 0,3% como al Em 0,75% con el control de amibas a lo largo del tiempo, se observó que el aislado creció más lentamente que el control de amibas, produciéndose el pico máximo de crecimiento a las 96 horas, es decir, 24 horas después que el control de amibas.

En la evaluación del efecto del DMSO 1,5% y el extracto Em 3,8 mg/ml (Figura 7), se observó que el número de amibas del aislado A27 disminuyó a las 48 y 72 horas ($p < 0,05$) y a las 96 horas sólo aumentó en el aislado con control de DMSO 1,5% ($p < 0,05$). Al comparar el crecimiento del control de DMSO 1,5% con el control de amibas, ocurrió un aumento de la población desde las 72 hasta las 96 horas.

En la Tabla 2, se muestra el cálculo de la capacidad lítica de las diferentes concentraciones del

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

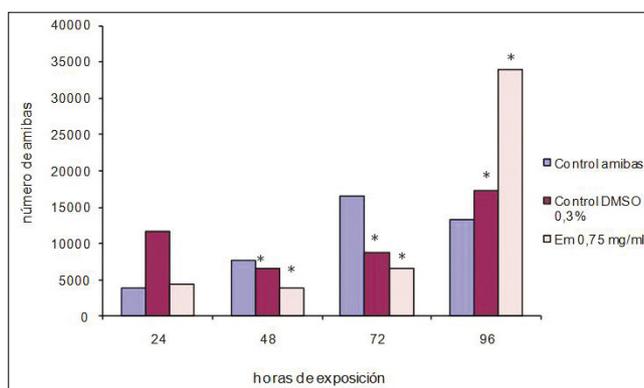


Figura 6. Efecto del extracto Em de *Pera distichophylla* 0,75 mg/ml y del control de DMSO 0,3% sobre los trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27. (*: p < 0,05).

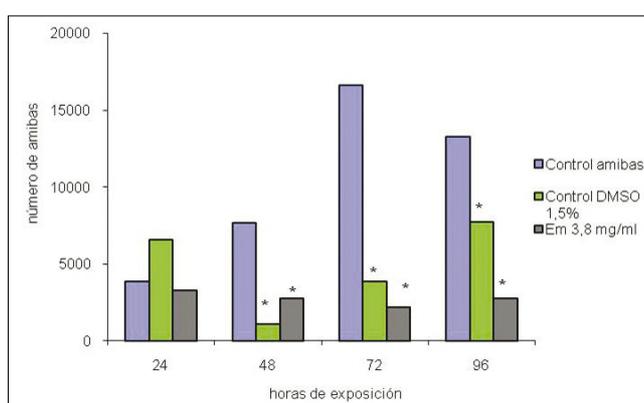


Figura 7. Efecto del extracto Em de *Pera distichophylla* 3,8 mg/ml y del control de DMSO 1,5% sobre los trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* spp., aislado A27 (*: p < 0,05).

extracto Em y de los controles de DMSO. Las concentraciones ensayadas de los controles de DMSO (0,3 y 1,5%) presentaron efecto lítico sobre el aislado a las 48 y 72 horas del ensayo, siendo mayor éste a la concentración de 1,5%. En cuanto al extracto metanólico, tiene capacidad lítica en ambas concentraciones a las 48 horas de incubación, pero el efecto se prolonga hasta las 96 horas para el extracto a mayor concentración (3,8 mg/ml). Al comparar ambas concentraciones del Em con sus respectivos controles de DMSO, estos mostraron menor capacidad lítica en todas las horas de observación, excepto el Em 3,8 mg/ml a las 96 horas.

3.- Evaluación del efecto del Eh y Em sobre la viabilidad del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp.

Al evaluar la viabilidad del aislado A27 en

presencia de Eh y Em, se observó que el porcentaje de viabilidad de los trofozoitos y quistes oscila entre 80 y 100% en todas las concentraciones de DMSO y de los extractos a lo largo de los ensayos, excepto a las 24 horas para el extracto Em 3,8 mg/ml, con un 72,7% de viabilidad.

4.- Comprobación del efecto sobre el crecimiento del aislado A 27 de *Acanthamoeba* spp. en medio de Page modificado en placas de Petri, a los 7 días después de ser expuesto a diferentes concentraciones del Eh y Em de *P.distichophylla* y de los controles de DMSO en distintos tiempos.

La presencia de trofozoitos y el incremento en su número, al comparar la observación efectuada a las 2 horas respecto a la observación a los 7 días, demostró crecimiento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

DISCUSIÓN

Se ha señalado que el diagnóstico temprano de una lesión corneal por *Acanthamoeba* spp. podría resultar en curación (Kilvigton *et al.*, 2002). Sin embargo, recientes trabajos demuestran que la amiba puede permanecer en la cornea de un paciente curado clínicamente. Los quistes presentes en el estroma, resistentes a la terapia son considerados “quistes durmientes” (Shuste y Visvesvara, 2004). En estos casos, los tratamientos alternativos adquieren mayor importancia.

El uso de productos naturales y/o sus derivados en el tratamiento de pacientes con queratitis acantamibiana y úlceras corneales ha sido evaluado tanto *in vitro* (Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008) como *in vivo* (Vural *et al.*, 2007). De estos reportes, se deriva la necesidad de evaluar la susceptibilidad de cada especie de *Acanthamoeba* a los diferentes extractos de una misma planta, ya que estudios previos con plantas de la familia *Apocynaceae* muestran que *in vitro* no poseen la misma actividad contra microorganismos similares. Adicionalmente, un número de extractos de plantas relativamente importante se ha reportado con efecto tumoricida y microbicida, sin embargo, no mostraron actividad contra *Acanthamoeba* (Chu *et al.*, 1998).

La evaluación del efecto del Eh y Em obtenidos de *P. distichophylla* sobre el aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. *in vitro*, se realizó determinando la actividad de dos concentraciones diferentes de cada extracto. La selección de estas concentraciones se estableció con base en los resultados obtenidos por Salazar (2004), quien utilizó y evaluó un extracto crudo alcohólico (Ec) de esta planta sobre el mismo aislado de *Acanthamoeba* spp., a concentraciones de 1 mg/ml y 10 mg/ml (Salazar, 2004).

La acción de varios extractos de plantas como *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*, especies de *Allium* y plantas del sureste asiático, entre otras, sobre especies de *Acanthamoeba* ha sido evaluada empleando concentraciones que variaron entre 0,1 hasta 32 mg/ml (Chu *et al.*, 1998; Polat *et al.*, 2007 a y b). En este estudio, con *P. distichophylla*, la evaluación de concentraciones de Eh y Em a 0,75 y 3,8 mg/ml en vez de 1 y 10 mg/ml, se debió a que, por ser estos extractos particularmente pigmentados, no se pudieron emplear las concentraciones superiores a 5 mg/ml, ya que dificultaron

las observaciones al microscopio.

Al exponer los trofozoítos del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. a las diferentes concentraciones del Eh, las modificaciones morfológicas observadas a partir de las 72 horas, detectadas también en los controles de DMSO respectivos, parecen ser efecto de la acción de este solvente. Resultados similares fueron obtenidos por Salazar (2004), en los que el mismo aislado expuesto al Ec a la concentración de 1 mg/ml, presentó modificaciones en la morfología de los trofozoítos ocasionados por el DMSO. Este mismo efecto parece ocurrir para el extracto Em sólo a la concentración de 3,8 mg/ml y su control de DMSO 1,5%, a diferencia del control de DMSO 0,3% donde no se observó variaciones morfológicas significativas, pero sí a la concentración del Em 0,75 mg/ml, indicando un posible efecto del extracto a esta concentración sin influencia del DMSO.

Cabe resaltar que a las 96 horas de exposición a ambas concentraciones del extracto Eh, no se observó ninguna alteración en los trofozoítos. Con el Em, se observó este mismo efecto para la concentración de 0,75 mg/ml. Estos hallazgos sugieren que los cambios pudieran ser reversibles o que los extractos afectaron a algunos de los trofozoítos y a otros no, permaneciendo sin alteraciones morfológicas los no afectados a las 96 horas. Sin embargo, a la concentración de 3,8 mg/ml del Em, sí se presentaron alteraciones morfológicas en el aislado a las 96 horas, pero a diferencia del efecto de la concentración de 0,75 mg/ml, que se evidencia desde las 2 horas hasta las 72 horas de exposición, el efecto del Em 3,8 mg/ml se manifiesta a partir de las 48 horas, extendiéndose hasta el final del experimento, indicando un posible retraso en la aparición de las variaciones morfológicas y por ende, una prolongación del efecto.

Por otra parte, no se observó ninguna modificación de las formas quísticas del aislado A27 al microscopio óptico, durante el tiempo de exposición a los extractos Eh y Em. Dado que la pared quística de este protozoario es de naturaleza quitinosa, conformada por dos capas, el exo y el endoquiste, esta característica pareciera conferir cierta resistencia a la penetración tanto de los extractos como del DMSO. Estas observaciones difieren de lo reportado por algunos autores para el DMSO y su efecto en el aumento de la penetración de ciertas drogas sobre las formas quísticas de *Acanthamoeba* spp. resistentes a la propamida, proponiendo que

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

el DMSO actúa como un transportador para algunas drogas (Neal *et al.*, 1974; Saunders *et al.*, 1992). Debido a que en este trabajo no se observó ningún efecto sobre las formas quísticas y para descartar modificaciones no perceptibles, tanto bioquímicas como estructurales, sería recomendable realizar otra técnica, como la microscopía electrónica, que permita detectar si se producen tales cambios.

La evaluación del Eh y Em de *P. distichophylla* sobre el número de amibas se realizó a las 24 horas. Algunos investigadores recomiendan para el estudio de extractos naturales y sus efectos sobre *Acanthamoeba* spp., incubar a partir de 24 horas y extenderlas en el tiempo, para poder observar efectos tales como la capacidad lítica (Chu *et al.*, 1998).

Para el extracto Eh a la concentración de 0,75 mg/ml y su respectivo control de DMSO 0,7%, se observó que la tendencia de crecimiento del aislado A27 en presencia de DMSO 0,7% alcanzó el pico máximo de crecimiento a las 72 horas y disminuyó progresivamente hasta las 96 horas de incubación, sin intervención de actividad lítica alguna por parte del DMSO, a diferencia del crecimiento del aislado con el Eh 0,75 mg/ml, el cual alcanzó el pico máximo de crecimiento a las 48 horas y disminuyó rápidamente hasta las 96 horas. Esto parece indicar que la concentración de Eh 0,75 mg/ml afecta al aislado A27 acelerando su crecimiento máximo en estos cultivos al inicio del experimento, pero a su vez propiciando una disminución marcada del número de amibas luego de alcanzar el pico máximo, relacionada a su vez con la capacidad lítica del extracto Eh 0,75 mg/ml, manifiesta a partir de las 72 horas.

Para la concentración de Eh 3,8 mg/ml y su respectivo control DMSO 3,5%, el aislado A27 exhibió un comportamiento diferente: en ambos casos no se observó un número máximo de amibas durante el experimento, sino un crecimiento discreto y continuo para el DMSO y poca variación en el recuento de amibas para el extracto, semejando una fase estacionaria, relacionado ambos con la ausencia de capacidad lítica por parte del DMSO y el extracto. Estas observaciones parecen indicar una posible adaptación del aislado al Eh 3,8 mg/ml y su solvente o una disminución en la tasa de proliferación celular del protozoario, lo que podría demostrarse al extenderse el tiempo de incubación hasta obtener un cambio en la tendencia de crecimiento

del aislado en presencia de este extracto.

El efecto de disminución de la división celular evidenciado a medida que aumenta la concentración del extracto Eh sobre el aislado A27 de *Acanthamoeba* spp., puede ser comparado con lo obtenido por Salazar (2004) con el mismo aislado de *Acanthamoeba* y el extracto crudo alcohólico (Ec) de *P. distichophylla* Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008 Chu *et al.*, 1998; Derda *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2007a, 2008; por Rodríguez-Ortega y col. (2006) usando el mismo extracto Ec de *P. distichophylla* sobre epimastigotes de *T. cruzi*¹⁹ y por otros trabajos que evaluaron actividad amebicida de extractos naturales de plantas como *Allium* spp., *Thymus* spp., *Ipomoea* sp, *Kaempferia galanga* y *Cananga odorata*^{12,26,15-17}. Sería entonces recomendable probar concentraciones mayores de este extracto, tomando en cuenta que la toxicidad del DMSO como solvente no exceda de 10%.

Durante la evaluación del efecto del Em sobre el número de amibas del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp., la obtención de un pico máximo de crecimiento a las 96 horas en presencia de Em 0,75 mg/ml y de DMSO 0,3%, en vez de a las 72 horas como el control de amibas, sugiere un discreto retardo en la tasa de multiplicación relacionado con el efecto de lisis del extracto y su solvente al inicio del experimento y la ausencia del mismo a las 96 horas de incubación. En cuanto al efecto del DMSO 1,5% sobre el aislado A27, éste produjo un posible retraso en la adaptación del parásito hasta las 48 horas y por ende, una aparición tardía del pico máximo de crecimiento a las 96 horas, mientras que el Em 3,8 mg/ml generó una disminución constante del número de parásitos hasta el final del experimento, relacionándose la misma con la presencia de lisis durante todos los tiempos de incubación. Por lo tanto, pareciera que a mayor concentración de Em se prolonga la capacidad lítica del extracto.

En este ensayo, según los resultados obtenidos, aparentemente podría haber una interacción entre el

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

extracto Em y su solvente que modificaría la capacidad lítica observada para el DMSO, disminuyéndola o inclusive, anulándola, excepto para el caso del Em 3,8 mg/ml y DMSO 1,5% a las 96 horas de incubación. Este hallazgo no fue observado para el Eh. Se ha reportado que las propiedades terapéuticas y/o tóxicas de algunos agentes probablemente aumenten al combinarse con el DMSO, por ejemplo, para la actividad del diacetato de clorhexidina, pero también hay estudios que refieren poca o ninguna modificación de la actividad de compuestos como la polihexametilen biguanida (Brayton 1986; Larkin *et al.*, 1992; Khunkitti 1996). Esto podría estar ocurriendo en el caso del extracto Em 0,75 mg/ml.

La viabilidad del aislado sometido a la actividad de los extractos no mostró cambios importantes, por lo cual, pareciera no haber daños en la membrana plasmática de los trofozoítos ni de la pared quística, lo cual debería ser comprobado con la evaluación a nivel ultraestructural. Sin embargo, sí se observó una posible acción de los extractos a nivel intracelular, ya que las amibas que no fueron afectadas por la acción lítica de los extractos, mostraron cambios morfológicos, en los que se observan modificaciones a nivel citoplasmático como la aparición de vacuolas, con o sin gránulos, pero sin provocar la muerte celular, al menos en el tiempo de experimentación. Estudios anteriores con el Género *Pera* y amibas del Género *Acanthamoeba* reportan para ensayos de viabilidad los mismos resultados de este trabajo, demostrándose que estos extractos actúan principalmente sobre la morfología y proliferación celular de estos parásitos (Salazar, 2004).

La evaluación cualitativa del crecimiento a los 7 días en cultivos en placas de petri, permitió evidenciar que, aparte de conservar su viabilidad y aun con modificaciones en su morfología en algunos casos, el aislado es capaz de crecer en estos cultivos. Sería recomendable, por lo tanto, realizar este ensayo de manera cuantitativa, ajustando los inóculos iniciales luego de la recolección de cada pozo, para evaluar la proliferación del aislado en cada caso a los 7 días de incubación y estimar así el efecto de los extractos sobre su crecimiento en cultivos a largo plazo.

En conclusión, de los extractos de *P. distichophylla* ensayados, sólo el Em 0,75 mg/ml afectó la morfología de los trofozoítos del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp., mientras que la morfología

de los quistes no se alteró en presencia ninguno de los extractos. Eh a la concentración de 0,75 mg/ml, aparentemente disminuyó la proliferación celular, no así el Em. Ambos extractos a la concentración de 3,8 mg/ml permiten la proliferación celular. En relación a la lisis celular, solo Em demostró tener capacidad lítica sobre el aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. Estos extractos actúan principalmente sobre la morfología y proliferación celular de estos parásitos sin afectar su viabilidad, demostrado al evidenciarse crecimiento del aislado en cultivos de Page modificado en placas de petri, luego de haber sido expuesto a la acción de los extractos.

REFERENCIAS

1. BRAYTON CF. 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review.[Resumen]. Cornell Vet. 76: 61-90.
2. CHU DAN-MY, MILES H, TONEY D, NGYUEN C, MARCIANO-CABRAL F. 1998. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. Parasitol. Res. 84: 746-752.
3. DERDA M, HADAS E, THIEM B, SULEK A. 2004. Amebicidal plants extracts [Resumen]. Wiad Parazytol. 50: 715-721.
4. DERDA M, SULEK-STANKIEWICZ A, HADAŚ E. 2006. Free-living amoebae as vehicles of pathogenic bacteria [Resumen]. Wiad Parazytol. 52: 1-7.
5. ISHIBASHI Y. 1997. *Acanthamoeba* keratitis. Ophthalmologica. 211 (Suppl 1): 39-44.
6. JERCIC MI. 2007. Amebas de vida libre género *Acanthamoeba*. Retrato microbiológico. Rev Chil Infect. 24: 491-492.
7. KILVINGTON S, HUGHES R, BYAS J, DART J. 2002. Activities of therapeutic agents and myristamidopropyl dimethylamine against *Acanthamoeba* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 46: 2007-2009.
8. KHUNKITTI W, LLOYD DE, FURR JR, RUSSELL AD. 1996. The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. [Resumen]. J Appl Bacteriol. 81: 73-77.
9. LARKIN DF, KILVINGTON S, DART JK. 1992. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. Ophthalmol. 99: 185-191.
10. LUNA D. 2003. Fitoquímica de *Pera glabrata* y *Pera distichophylla*. Actividad Biológica [Tesis Doctoral]. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias.
11. MATHERS WD. 2004. *Acanthamoeba* A difficult pathogen to evaluate and treat Editorial. Cornea. 23: 325.
12. MORALES ROJAS T, CASTILLO A. 2005. Catálogo dendrológico comentado del bosque ribereño de las confluencias de los ríos Cuao-Sipapo (Estado Amazonas, Venezuela). Acta Bot.Venez. 28: 63-87.
13. NEAL RA, LATTER VS, RICHARDS WHG. 1974. Survival of *Entamoeba* and related amoeba at low

Firmado por:		Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

- temperature-II. Viability of amoeba and cysts stored in liquid nitrogen. *Int. J Parasitol.* 4: 353-360.
14. ODDÓ D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómicos-clínicos. *Rev Chil Infect.* 23: 200-214.
 15. PAGE FC. 1974. A further study of taxonomic criteria for *Limax* amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenkd.* 116: 149.
 16. PAGE FC. 1988. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater, biological association. UK Ambleside. Cumbria. 122.
 17. PÉREZ DE GALINDO MV. 1995. Hallazgo de *Acanthamoeba* sp, *Naegleria* sp y otras amebas de vida libre en pacientes y portadores asintomáticos [Trabajo presentado ante la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, para optar al ascenso en el escalafón universitario a Profesor Agregado]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis; 1995.
 18. PÉREZ DE GALINDO MV. 2005. Actualización en el conocimiento de amebas de vida libre potencialmente patógenas. Aportes a su estudio en Venezuela, particularmente de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. [Trabajo presentado ante la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, para optar al ascenso en el escalafón universitario a Profesor Asociado]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis;
 19. POLAT ZA, TEPE B, VURAL A. 2007a. *In vitro* effectiveness of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. *Parasitol Res.* 101: 1551-1555.
 20. POLAT ZA, VURAL A, TEPE B, CETIN A. 2007b. *In vitro* amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Parasitol Res.* 101: 397-402.
 21. POLAT ZA, VURAL A, OZAN F, TEPE B, OZCELIC S, CETIN A. 2008. *In vitro* evaluation of the amoebicidal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potentials on corneal cells [Resumen]. *J Ocul Pharmacol Ther.* 24: 8-14.
 22. RODRÍGUEZ-ZARAGOZA S, ORDAZ C, AVILAS G, MUÑOZ G, ARCINIEGAS A, ROMO AS. 1999. *In vitro* evaluation of the amoebicidal activity of *Budleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*. *J Ethnopharmacol.* 66: 327-334.
 23. RODRÍGUEZ-ORTEGA M, LUNA D, CANÓNICO Y, CARVAJAL Z, MÉNDEZ J, BRICEÑO L. 2006. Extracts from *Pera glabrata* (Schott) and *Pera distichophylla* with anti-parasite and antiviral activity. *Ciencia.* 14: 492-497.
 24. SALAZAR LS. 2004. Evaluación de la actividad biológica del extracto crudo alcohólico (Ec) obtenido de *Pera distichophylla* (Euphorbiaceae) proveniente del Amazonas sobre el aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. [Trabajo Especial de Investigación para optar al título de Licenciada en Bioanálisis-UCV]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis;
 25. SAUNDERS PP, PROCTOR EM, ROLLINGS DF, RICHARDS JS. 1992. Enhanced killing of *Acanthamoeba* cysts in vitro using Dimethylsulfoxide [Resumen]. *Ophthalmol.* 99: 1197-200.
 26. SCHUSTER FL, VISVESVARA G. 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol.* 26: 91-120.
 27. SEAL DV. 2003. *Acanthamoeba* queratitis: update, incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye.* 17: 893-905.
 28. VAN DER BIJL P, VAN EYK A, SEIFART H, MEYER D. 2004. *In vitro* transcorneal penetration of metronidazole and its potential use as adjunct therapy in *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 23: 386-389.
 29. VURAL A, POLAT ZA, TOPALKARAA, TOKER MI, ERDOGAN H, ARICI MK, et al. 2007. The effect of propolis in experimental *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 35: 749-754.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Ensayos preliminares con extracto crudo alcohólico (Ec) de *Pera distichophylla* sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp productor de úlcera corneal

WAGNER C. M.¹, SALAZAR L. S.¹, DORTA A.¹, PÉREZ DE G. M. V.¹, BLANCO DE M. J.², GALINDO M. V.¹, NESSIA.¹, VETHENCOURT M. A.¹, BANDES A.¹, GUZMÁN DE R. C. T.¹

- ¹ Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela.
² Grupo de Productos Naturales, Escuela de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

ABSTRACT

PRELIMINARY *IN VITRO* SCREENING USING A *PERA DISTICHOPHYLLA* ALCOHOLIC EXTRACT (EC) AGAINST AN *ACANTHAMOEBA* SPP ISOLATE RESPONSIBLE OF CORNEAL ULCER

Actually, infections due to *Acanthamoeba* spp have increased, specially at cornea and its treatment has limitations. New options for treatment have been proved, including a large number of therapeutic agents and natural products, which have been tested *in vitro* to evaluate the amoebicidal activities against this pathogen organism. In this sense, we proposed to evaluate *in vitro* biological activities of crude alcoholic extract (Ec) from *Pera distichophylla*, an amazonic plant, against an *Acanthamoeba* spp isolate (A27), obtained from a patient who suffered a corneal ulcer. We evaluated the effects of 1 and 10 mg/ml concentrations of Ec against *Acanthamoeba* spp trophozoites and cysts in 24-wells polystyrene microplates. Growth amoeba inhibition was observed, at both Ec concentrations exposure, being greater at 10 mg/ml; morphologic changes were also detected in vegetative forms, as rounding and vacuolization, signs of cell degeneration or death. No morphologic variations at light microscopy were seen in cystic forms after exposure to both Ec concentrations. These results suggest that Ec could produce trophozoites lysis and have amoebostatic, lytic and amoebicidal effects at 1 and 10 mg/ml concentrations. We recommend to complement this study evaluating other concentrations of Ec and possible ultrastructural cell changes by other techniques like electronic microscopy.

Key words: *Acanthamoeba* spp, *Pera distichophylla*, corneal ulcer, treatment.

RESUMEN

Las infecciones causadas por *Acanthamoeba* spp se han incrementado, especialmente en la cornea y

Recibido: 15 de Junio de 2011. Aceptado 15 de Mayo de 2012.

Correspondencia: Carolina M Wagner A.

E-mail: bioparas@ucv.ve, cwagnera@gmail.com

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

el tratamiento de las mismas tiene limitaciones. En la constante búsqueda de nuevos medicamentos para el tratamiento de estas afecciones, un gran número de agentes terapéuticos y de extractos de plantas han sido analizados *in vitro* para evaluar su actividad amebicida contra este patógeno. En este sentido, se planteó evaluar *in vitro* la actividad biológica del extracto crudo alcohólico (Ec), obtenido de *Pera distichophylla*, una planta del Amazonas, sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp (A27), proveniente de un paciente con úlcera corneal. Se evaluó el efecto del extracto Ec a concentraciones de 1 mg/ml y 10 mg/ml sobre trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* spp, en placas de poliestireno de 24 pozos. Se observó inhibición en el crecimiento amibiano, a ambas concentraciones evaluadas, siendo mayor el efecto a 10 mg/ml; también se observaron cambios morfológicos en los trofozoitos, como redondeamiento y vacuolización, como signos de degeneración y muerte celular. En los quistes, no se observaron cambios morfológicos visibles al microscopio de luz, ni variaciones en el tamaño, al ser enfrentados a las concentraciones estudiadas. Los resultados sugieren que el extracto pareciera producir lisis en los trofozoitos y actividades amebostática, lítica y amebicida a las concentraciones de 1 y 10 mg/ml. Se sugiere evaluar otras concentraciones para complementar los resultados obtenidos en este trabajo y realizar estudios ultraestructurales para la detección de modificaciones en la célula.

Palabras claves: *Acanthamoeba* spp, *Pera distichophylla*, úlcera corneal, tratamiento.

INTRODUCCIÓN

Las plantas y sus derivados han representado, desde la antigüedad, una buena opción terapéutica para algunas enfermedades. Venezuela posee en el Amazonas, gran diversidad de especies vegetales algunas con propiedades curativas, y se ubica como uno de los países con mayores fuentes naturales para el desarrollo de la industria farmacéutica en el tratamiento de enfermedades. En los últimos años, las infecciones por *Acanthamoeba* spp se han incrementado, especialmente las afecciones oculares por *Acanthamoeba* spp (Díaz *et al.*, 1993; Bermúdez *et al.*, 1997;) y el tratamiento farmacológico utilizado tiene ciertas limitaciones (Dribe *et al.*, 1988; Kilvington *et al.*, 1990). En la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para un tratamiento efectivo contra este protozoario, surge la inquietud de evaluar productos naturales provenientes de plantas, ya que se ha reportado la existencia de actividad amebicida de algunos extractos sobre diferentes especies de *Acanthamoeba* (My Chu *et al.*, 1998; Vural *et al.*, 2007; Polat *et al.*, 2007a,b; 2008). Con el análisis fitoquímico y biológico de una planta del Amazonas, *Pera distichophylla*, se demostró que el extracto crudo alcohólico (Ec) de hojas y ramas posee actividad antiparasitaria sobre *Trypanosoma cruzi* (Luna, 2003). Estos ensayos fueron ampliados por Rodríguez-Ortega y colaboradores, al evaluar la actividad anti- parasitaria para *T. cruzi*

de los extractos acuosos (Ea) y alcohólicos (Ec) de *Pera glabrata* y de *Pera distichophylla*, así como su actividad antiviral sobre los virus de dengue y fiebre amarilla, obteniéndose inhibición de la replicación de epimastigotes de *T. cruzi* por los Ea de ambas plantas y en especial, del Ea de *P. glabrata* sobre la replicación de las formas amastigotas del parásito. En relación con el virus del dengue y de la fiebre amarilla, los Ec fueron más efectivos que los Ea (Rodríguez *et al.*, 2006). En las infecciones por *Acanthamoeba* spp, el uso de extractos naturales sería una excelente alternativa ante las limitaciones actuales para el tratamiento de las mismas. Basado en estas investigaciones, se planteó evaluar *in vitro* la actividad biológica del Ec obtenido de *Pera distichophylla*, sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp, A27, proveniente de un paciente con úlcera corneal.

MATERIAL Y MÉTODO

Material vegetal: *Pera distichophylla* (Euphorbiaceae), fue identificada y recolectada por el Prof. Anibal Castillo (Universidad Central de Venezuela, Instituto de Biología Experimental), cerca del Río Sipapo, Municipio Autana, Estado Amazonas. En el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela fueron obtenidos 3

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

extractos (crudo alcohólico, hexanólico y metanólico) (Luna, 2003). En este trabajo se evaluó el extracto crudo alcohólico (Ec).

Se prepararon dos soluciones madres del Ec: 3 mg/ml y 30 mg/ml, solubilizadas en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 % y se completó con agua destilada estéril hasta un volumen final de 15 ml. El porcentaje final de DMSO de cada solución fue de 10%. Previamente, se realizaron ensayos de toxicidad de este compuesto sobre el aislado de *Acanthamoeba* spp, empleando concentraciones desde 1% hasta 12,5%.

Material biológico: El aislado de *Acanthamoeba* spp, designado como A27 según nomenclatura propia del Laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (UCV), fue obtenido en este laboratorio a partir de una muestra de raspado de úlcera corneal, tomada a una paciente de 27 años de edad, quien presentó una lesión ocular, la cual ameritó la toma de esta muestra para el diagnóstico etiológico; como antecedente epidemiológico, la paciente informó ser usuaria de lentes de contacto blandos por 9 años. Este aislado ha sido mantenido en el medio de cultivo bifásico de Page modificado por Chinchilla *et al.*, (1979) en placas de petri y fue adaptado al crecimiento en placas de poliestireno de 24 pozos para realizar los bioensayos.

Bioensayos: El efecto del Ec sobre la morfología y viabilidad del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp, así como la capacidad lítica del Ec sobre el mismo, fueron evaluados al exponer una suspensión de 1×10^4 amibas/ml de cultivo (trofozoítos y quistes) a las concentraciones de 1 mg/ml y 10 mg/ml a las 24, 48, 72 y 96 horas. Estos bioensayos se realizaron en el medio de cultivo bifásico de Page modificado por Chinchilla *et al.*, (1979), en placas de poliestireno de 24 pozos Nunc®, y una suspensión de *Escherichia coli* (patrón 0,5 Mac Farland) en la fase líquida de este medio (Pérez de Galindo, 1975; Chinchilla *et al.*, 1979). Para todos los ensayos, se estableció un control de amibas con el medio de cultivo y un control de DMSO al 3%, siendo ésta la concentración del solvente que se obtuvo al realizar las diluciones de las soluciones madres en los pozos.

Los bioensayos se realizaron por duplicado, incubando los trofozoítos y/o quistes con las dos concentraciones del Ec a 37°C; al concluir cada tiempo, se recolectó el contenido de cada pozo, colocando en tubos de centrifuga graduados y

estériles y se midió el volumen obtenido. Se tomó una alícuota para observar la morfología y se realizó el recuento de las amibas. Posteriormente, se realizó un lavado con medio de cultivo líquido, se centrifugó a 150 g y se eliminó el sobrenadante, para detener el efecto de los extractos y del DMSO. Estos bioensayos se detallan a continuación:

1.- Evaluación del efecto del Ec sobre la morfología de *Acanthamoeba* spp

La morfología del aislado fue estudiada cualitativa y morfométricamente. Los criterios que definen el efecto sobre la morfología descrita al microscopio de luz con 400 aumentos son: modificaciones en el tamaño y forma de los trofozoítos y quistes, cambios en el aspecto del citoplasma respecto a vacuolas digestivas y/o contráctiles, al compararlo con la morfología característica del aislado antes de ser expuesto al Ec.

2.- Evaluación del efecto del Ec sobre la viabilidad de los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp

La viabilidad del aislado se evaluó posterior al contacto con el Ec, utilizando el método de exclusión de dos colorantes supravitales: Azul de Tripano 0,4% y Rojo Congo 0,4 % y fue reportada en porcentaje (%) de células vivas (Jiménez, 2003). Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (Olympus), con objetivo de 10x y 40x, considerando el número de células vivas entre 100 células totales contadas. El % de viabilidad celular se calculó, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas}}{\text{Total de células}} \times 100$$

3.- Evaluación de la capacidad lítica del Ec sobre los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* spp

La evaluación de la capacidad lítica del Ec sobre el aislado se realizó mediante el recuento de amibas antes y después del contacto de las mismas con el extracto. Se colocó un inóculo inicial y posteriormente, al concluir cada tiempo de incubación de las amibas con las concentraciones del Ec, se recogió el volumen de cada uno de los pozos por separado y se colocó una gota de la suspensión en cámara de Neubauer para realizar el recuento final de las amibas. El porcentaje de lisis se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Porcentaje (%) de lisis= $\frac{\text{N}^\circ \text{ de amibas (T y Q) iniciales} - \text{N}^\circ \text{ de amibas (T y Q) finales}}{\text{N}^\circ \text{ de amibas (T y Q) iniciales}} \times 100$

T: trofozoítos

Q: quistes

RESULTADOS Y DISCUSION

El uso de productos naturales y/o sus derivados en el tratamiento de pacientes con queratitis acantamibiana y úlceras corneales ha sido evaluado tanto *in vitro* (Polat *et al.*, 2007a,b; 2008; My Chu, 1998; Derda *et al.*, 2004) como *in vivo* (Vural *et al.*, 2007). De estos reportes, se deriva la necesidad de evaluar la susceptibilidad de cada especie de *Acanthamoeba* a los diferentes extractos de una misma planta, ya que estudios previos con plantas de la familia *Apocynaceae* muestran que *in vitro* no poseen la misma actividad contra microorganismos similares. La disponibilidad de algunos extractos de la planta *Pera distichophylla* y sus antecedentes de actividad antiparasitaria ofrecieron la posibilidad de evaluar sus efectos *in vitro* sobre un aislado de *Acanthamoeba* spp, A27, productor de úlcera corneal (Luna, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006).

La morfología de los trofozoítos y quistes del aislado A27 se observó al microscopio óptico a 400 aumentos, antes de ser expuesto al Ec. En los quistes se apreció una doble pared quística, conformada por un exoquiste, moderadamente ondulado y un endoquiste poliédrico o estrellado. Se destacó un citoplasma granular y vacuolar, pero sin distinguirse el núcleo. Cuando se realizaron las medidas de los mismos, presentaron un diámetro entre 12,5 y 20 μm , con un tamaño promedio de 16 μm (Figura 1).

Los trofozoítos mostraron una movilización lenta, a través de la emisión de uno o dos pseudópodos hialinos, con abundantes acantopodios a lo largo de toda la célula. El endoplasma se observó granular, con una o dos vacuolas contráctiles. Las medidas oscilaron entre 17,5 y 37,7 μm , teniendo un valor medio de 27 μm (Figura 2), concordando estas descripciones de trofozoítos y quistes del género *Acanthamoeba* con las hechas por otros autores (Rondanelli y Scala, 1987).

Después de haber sido expuestos al efecto del Ec a concentraciones de 1 y 10 mg/ml, se realizó la observación microscópica y micrometría para los quistes y trofozoítos. Los parámetros morfométricos

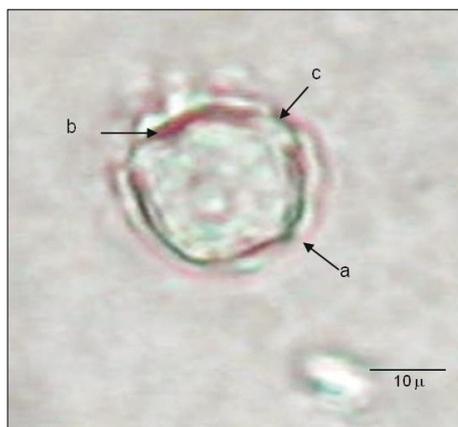


Figura 1. Quistes de *Acanthamoeba* spp, aislado A27, antes de la exposición al extracto Ec de *Pera distichophylla*. Examen directo en medio líquido de Page modificado. 1.000 aumentos. Quiste con 4 puntas, donde se evidencia ecto (a) y endoquiste (b), con poro u ostiolo (c).

de los trofozoítos y quistes se resumen en la Tabla 1. La morfología de los quistes no varió a ninguna de las dos concentraciones del Ec evaluadas: ni en el control con el DMSO 3%. El tamaño y las características morfológicas de la pared y del interior de los quistes variaron poco comparados con los quistes control y los expuestos al DMSO, debido probablemente a la naturaleza quitinosa de la pared quística, lo cual le confiere resistencia a la penetración del Ec. Para complementar estas observaciones y al no determinarse cambios morfológicos visibles en los quistes al microscopio óptico, se sugiere realizar estudios ultraestructurales, para detectar si hay modificaciones en alguno de los organelos celulares.

Respecto a la morfometría de los trofozoítos, para todos los casos, se observó una disminución en el tamaño, al ser comparados con el control sin exponer al tratamiento con Ec y DMSO. Además, se observó redondeamiento de los mismos, lo cual se mantuvo a lo largo del experimento, para la con-

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha:
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25



Figura 2. Trofozoito de *Acanthamoeba* spp, aislado A27, antes de la exposición al extracto Ec de *Pera distichophylla*. Examen directo en medio líquido de Page modificado, 1.000 aumentos. Se observa el ectoplasma (a) con escasos acantopodios (b) y endoplasma (c) Vacuola contráctil (d).

concentración de 1 mg/ml y para el control de DMSO 3%, por lo tanto, se puede considerar que el cambio de forma del trofozoito no es debido al Ec evaluado a esa concentración, sino al efecto del DMSO 3%. Para la concentración de 10 mg/ml, los trofo-

zoitos presentaron señales de degeneración celular como múltiples vacuolas. Además, se observó que a esta concentración pareciera se inhibió la capacidad del aislado A27 para enquistarse, ya que en el grupo control sin extracto, se observaron quistes a las 48 horas, mientras que las amibas expuestas al extracto no presentaron quistes para ese tiempo de estudio (Figura 3).

Luego de la exposición del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp a las dos concentraciones del Ec en todos los tiempos de exposición, se obtuvo quistes y trofozoitos 100% viables. Sin embargo, se destaca que para el recuento a la concentración de 10 mg/ml, el número de amibas fue inferior a 100, por lo que se infiere que probablemente hubo lisis de los quistes y trofozoitos, comparados con el control de DMSO 3% y con el recuento para la concentración de Ec 1 mg/ml.

La determinación de la capacidad lítica del Ec presentó algunos inconvenientes relacionados con la pigmentación intensa del mismo, lo cual dificultó el recuento de las formas evolutivas, especialmente a la concentración de 10 mg/ml.

La capacidad lítica del Ec a la concentración de 1 mg/ml a las 2 horas de exposición, fue de 37,5%, incrementando a medida que aumenta el tiempo de exposición al extracto, ya que a las 24 y 48 horas fue superior a 80% y para las 96 horas de exposición fue de 89,5%, indicando estos resultados que la capacidad lítica del Ec a la menor concentración

Tabla 1. Medidas de los quistes y trofozoitos del Aislado A27 de *Acanthamoeba* spp. después de haber sido enfrentados al extracto crudo alcohólico (Ec) de *P. distichophylla*

Ec 1 mg/ml		Ec 10 mg/ml		Control DMSO 3%	
Quistes	Trofozoitos	Quistes	Trofozoitos	Quistes	Trofozoitos
15,0	30,0	15,0	15,0	15,0	10,0
15,0	25,0	12,5	30,0	20,0	20,0
17,5	15,0	15,0	12,5	20,0	25,0
12,5	17,5	17,5	17,5	15,0	15,0
15,0	15,0	15,0	10,0	12,5	15,0
17,5	30,0	15,0	10,0	17,5	30,0
15,0	25,0	17,5	12,5	15,0	37,5
17,5	10,0	20,0	15,0	17,5	15,0
15,0	15,0	12,5	15,0	15,0	15,0
20,0	15,0	12,5	17,5	20,0	27,5
X= 16	X= 20	X= 15,3	X= 15,5	X= 17	X= 18

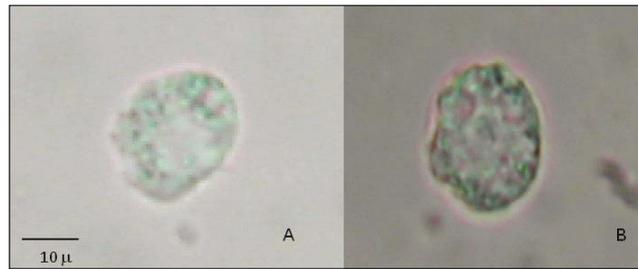


Figura 3. Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., aislado A27 (A y B), después de la exposición al extracto Ec de *Pera distichophylla*, 10 mg/ml. Examen directo en medio líquido de Page modificado, 1.000 aumentos. Se observa redondeamiento, vacuolización e inclusiones citoplasmáticas.

estudiada es tiempo dependiente. Para la concentración de 10 mg/ml solo se calculó la capacidad lítica para las 24 horas de exposición, por las dificultades de observación ya mencionadas, la cual fue de 89,5%. Se pudiera inferir que la acción es dosis dependiente para esta concentración. Para determinar el posible uso terapéutico del Ec, se requiere ampliar este diseño experimental probando otras concentraciones del Ec y relacionando la capacidad lítica del Ec y del DMSO, previa solución de los problemas presentados en el recuento de las amibas por la pigmentación del extracto Ec, empleando técnicas más específicas como el marcaje celular.

Los ensayos preliminares del extracto crudo alcohólico (Ec) de *Pera distichophylla* sobre el aislado A27 de *Acanthamoeba* spp permitieron demostrar que a una concentración de 10 mg/ml, el Ec produce redondeamiento y vacuolización del citoplasma de los trofozoítos de la amiba, sin modificaciones en los quistes. El Ec inhibió el crecimiento del aislado A27 de *Acanthamoeba* spp, a la concentración de 10 mg/ml y en menor grado a 1 mg/ml, debido probablemente a una inhibición en el desenquistamiento y/o a una lisis sobre los quistes y trofozoítos respectivamente. Debido a que el Ec de *P. distichophylla*, mostró tener actividad sobre este aislado, se sugiere evaluar otras concentraciones del Ec y otros extractos de esta planta sobre el mismo.

REFERENCIAS

1. BERMÚDEZ A, DIAZ O, PÉREZ MV, PÉREZ E. 1993. *Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas. An. Inst. Barraquer (Barc). 94; 24: 63-68.
2. CHINCHILLA M, CASTRO E, ALFARO M, PORTILLA E. 1979. Amebas de Vida Libre productoras de Meningoencefalitis. Primeros Hallazgos en Costa Rica. Rev Lat-Amer Microbiol. 21: 135-142.
3. DERDA M, HADAS E, THIEM B, SULEK A. 2004. Amebicidal plants extracts [Resumen]. Wiad Parazytol. 50: 715-21.
4. DÍAZ O, BERMÚDEZ A, PÉREZ MV, PÉREZ E. 1993. *Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del hospital Universitario de Caracas. Boletín INDIO (Ven). 10: 27-34.
5. DRIBE W, STERN G, EPSTEIN RJ, VISVESVARA GS, ADI M, KOMADINA T. 1988. *Acanthamoeba Keratitis*. Potencial role for topical clotrimazole in combination chemotherapy. Arch Ophthalmology. 106: 1196-1201.
6. JIMÉNEZ M. 2003. Estandarización de un protocolo de criopreservación para un aislado de *Acanthamoeba* spp. Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciada en Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.
7. KILVINGTON S, LARKIN DF, WHITE DG, BEECHING JR. 1990 Laboratory Investigation of *Acanthamoeba keratitis*. J Clin Microbiol. 28: 2722-2725.
8. LUNA D. 2003. Fitoquímica de *Pera glabrata* y *Pera distichophylla*. Actividad Biológica [Tesis Doctoral]. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias.
9. MY CHU D, MILES H, TONEY D, NGYUEN C, MARCIANO-CABRAL F. 1998. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. Parasitol Res. 84: 746-752.
10. PÉREZ DE GALINDO MV. 1995. Hallazgo de *Acanthamoeba* sp, *Naegleria* sp y otras amibas de vida libre en pacientes y portadores asintomáticos [Trabajo presentado ante la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, para optar al ascenso en el escalafón universitario a Profesor Agregado]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis.
11. POLAT ZA, TEPE B, VURAL A. 2007a. *In vitro* effectiveness of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var.

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

- sipyleus* on *Acanthamoeba castellani* and its cytotoxic potential on corneal cells. Parasitol Res. 101: 1551-1555.
12. POLAT ZA, VURAL A, TEPE B, CETIN A. 2007b. *In vitro* amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellani* and their cytotoxic potentials on corneal cells. Parasitol Res. 101: 397- 402.
 13. POLAT ZA, VURAL A, OZAN F, TEPE B, OZCELIC S, CETIN A. 2008. *In vitro* evaluation of the amoebicidal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Acanthamoeba castellani* and its cytotoxic potentials on corneal cells [Resumen]. J Ocul Pharmacol Ther. 24: 8-14.
 14. RODRÍGUEZ-ORTEGA M, LUNA D, CANÓNICO Y, CARVAJAL Z, MÉNDEZ J, BRICEÑO L. 2006. Extracts from *Pera glabrata* (Schott) and *Pera distichophylla* with anti-parasite and antiviral activity. Ciencia. 14: 492-497.
 15. RONDANELLI EG, SCAGLIA M. 1987. Pathogenic Amphizoic Amoebae. Infectious Diseases. Edit. Piccin Nuova Libreria. Pardia. Italia; 59-91.
 16. VURAL A, POLAT ZA, TOPALKARAA, TOKER MI, ERDOGAN H, ARICI MK, et al. 2007. The effect of propolis in experimental *Acanthamoeba* keratitis. Clin Experiment Ophthalmol. 35: 749-754.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Full length article

Apoptotic protein profile in *Leishmania donovani* after treatment with hexaazatrinaphthylenes derivatives



Atteneri López-Arencibia ^{a,*}, Carmen M^a Martín-Navarro ^a, Ines Sifaoui ^b,
María Reyes-Batlle ^a, Carolina Wagner ^{a,c}, Jacob Lorenzo-Morales ^a, José E. Piñero ^a

^a University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, La Laguna, Canary Islands, Spain

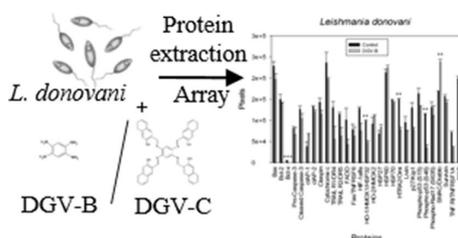
^b Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

^c Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

HIGHLIGHTS

- Two human arrays were performed on *Leishmania donovani* for apoptotic proteins and kinases.
- The hexaazatrinaphthylenes activated the programmed cell death by different pathways.
- Is still necessary an effort in order to clarify the proteins present in *Leishmania*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2015

Received in revised form

31 March 2016

Accepted 5 April 2016

Available online 7 April 2016

Keywords:

Hexaazatrinaphthylene

Leishmania

Apoptosis

Proteins

Array

ABSTRACT

Two hexaazatrinaphthylene derivatives, DGV-B and DGV-C previously known to induce an apoptotic-like process in *Leishmania donovani* parasites were used in this study.

For this purpose, two different human apoptotic arrays were used to determine the proteomic profile of the treated parasites compared to non-treated ones. One of the commercial arrays is able to detect the relative expression of 35 human apoptosis-related proteins and the other one is able to identify 9 different human kinases.

The obtained results showed that the two tested molecules were able to activate a programmed cell death process by different pathways in the promastigote stage of the parasite. The present study reports the potential application of two commercialised human apoptotic arrays to evaluate the action mechanism of active compounds at least against *Leishmania donovani*. The obtained data would be useful to establish the putative activated apoptosis pathways in the treated parasites and to further support the use of hexaazatrinaphthylene derivatives for the treatment of leishmaniasis in the near future. Nevertheless, further molecular studies should be developed in order to design and evaluate specific apoptotic arrays for *Leishmania* genus.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez, S/N, 38203, La Laguna, Canary Islands, Spain.

E-mail address: atlopez@ull.edu.es (A. López-Arencibia).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.005>

0014-4894/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmania species are obligate intracellular parasites that are transmitted to the mammalian host by the bites of infected sand flies. Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form, is a

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

group of diseases with a varied spectrum of clinical manifestations, ranging from small cutaneous nodules to wide mucosal tissue destruction (Reithinger et al., 2007). Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form, as the parasites migrated to vital organs. It is a severe, debilitating disease, characterized by prolonged fever, splenomegaly, hypergammaglobulinemia and pancytopenia. Patients gradually become ill over a period of a few months, and it is often fatal if untreated (Boelaert et al., 2000).

The World Health Organization (WHO) estimates that 1.5 million cases of CL and 500,000 cases of VL occur every year in 82 countries. CL is endemic in more than 70 countries worldwide, and 90% of cases occur in Afghanistan, Algeria, Brazil, Pakistan, Peru, Saudi Arabia and Syria (Hepburn, 2000; WHO, 2009). VL is presented in 65 countries; the majority (90%) of cases occur in agricultural areas and among the suburban depressed areas of five countries: Bangladesh, India, Nepal, Sudan, and Brazil (Desjeux, 2004). Estimates indicate that there are approximately 350 million people at risk for acquiring leishmaniasis, with 12 million currently infected worldwide (WHO, 2009).

The current available leishmanicidal treatments include pentavalent antimonials, amphotericin B, miltefosine, paramomycin and pentamidine (Alvar et al., 2006). These drugs can be administered alone or in combination (Olliaro, 2010; Seifert and Croft, 2006; Sundar et al., 2011). However, combinations of these drugs are normally highly toxic to the patient even at low doses. Furthermore, most of these treatments require several days of hospitalization because of its intravenous or parenteral way of administration. These side effects include teratogenic effects, nephrotoxicity, pancreatitis, ototoxicity and fever amongst others. Nevertheless, the appearance of resistant strains to these active compounds presents a major problem in the current therapeutic measures against these parasites (Croft et al., 2006; Maltezu, 2010). Moreover, since no immediate prospect of vaccines is expected (Singh and Sundar, 2012), there is a great need to develop novel leishmanicidal agents with an acceptable efficacy and safety profile.

The two molecules used in this study, DGV-B (1, 2, 4, 5-benzenetetraamine tetrahydrochloride) and DGV-C were recently reported to present leishmanicidal activity in both *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* species. Moreover, an induction of apoptosis-like processes in the treated parasites was observed due to positive phosphatidylserine exposure, DNA fragmentation, chromatin condensation, loss of mitochondrial membrane potential among others (López-Arencibia et al., 2015).

In addition DGV-B, which is precursor of hexaazatrinaphthylene synthesis, has been recently used as an anti-cancerogenous drug and has been shown to decrease tumour growth rates in breast cancer, human pancreatic tumours, human neuroblastoma, colon cancer and thyroid cancer by inhibiting the focal adhesion kinase (FAK) (Golubovskaya et al., 2008; Zheng et al., 2010; Beierle et al., 2010; Hochwald et al., 2009; Heffler et al., 2013; O'Brien et al., 2014).

In this study, the effects of these two hexaazatrinaphthylene at the protein level against *L. donovani* promastigotes were evaluated using two commercial human protein arrays related to apoptosis processes.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The DGV-B compound was purchased from Sigma-Aldrich™ (Madrid, Spain) and DGV-C was synthesized as previously described (López-Arencibia et al., 2015). In our previous study, the IC₅₀s of DGV-B and DGV-C against *L. donovani* promastigotes after

72 h were calculated as 25.05 and 4.66 μM, respectively. As well as the IC₉₀s of DGV-B and DGV-C which were previously calculated as 50 and 13.2 μM, respectively. The cytotoxicity assays against murine macrophages resulted in CC₅₀s of 46.1 and 17.5 μM for DGV-B and DGV-C after 24 h, respectively (López-Arencibia et al., 2015).

2.2. Parasite cultures

Experiments were carried out with *L. donovani* (MHOM/IN/90/GE1F8R) strain at the promastigote stage. Briefly, parasites were cultured in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum at 26 °C and were grown to the log phase previous use in further experiments. Moreover, the parasites were also cultured in RPMI 1640 medium (Gibco®, Life Technologies, Madrid, Spain), supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, with or without phenol red.

2.3. Differences on the expression of apoptotic proteins over the promastigote stage

The *in vitro* effect of the molecules was tested against the promastigote stage of *L. donovani* using the commercial kit: *Human Apoptosis Array Proteome Profiler™* (R&D Systems, Minnesota, USA), that simultaneously detects the relative expression of 35 proteins related to apoptosis processes in humans which are fixed in nitrocellulose membranes provided with the kit.

Briefly, promastigotes (10⁶ cells/ml) in RPMI 1640 medium without phenol red were treated with the IC₉₀ of DGV-B and DGV-C. After 24 h, treated and non-treated parasites (negative control) were washed for total protein extraction. Capture and control antibodies are spotted in duplicate on the nitrocellulose membranes of the array kit. Extracted proteins were diluted and incubated overnight with the membranes. The arrays were then washed to remove unbound proteins, followed by incubation with a cocktail of biotinylated detection antibodies. Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents were applied, and a signal was produced at each capture spot corresponding to the amount of protein bound. The membranes were developed by X-ray using a ChemiDoc XRS+ image capturer (Bio-Rad).

2.4. Phosphorylation analysis of different kinases over the promastigote stage

The *Human Phospho-Kinase Array 1 Proteome Profiler™* (R&D Systems, Minnesota, USA) was used for the assay. The kit uses an immune-assay technique for the simultaneous detection of seven phosphorylated kinases: Akt, ERK1/ERK2, GSK-3β, JNK, PAN, p38α, p70S6K y Src. The array was performed on a 96-well microplate, where each well presents 9 dots that correspond to the seven kinases, an internal control (Hsp60) and a reference dot.

Briefly, promastigotes (10⁶ cells/ml) were treated with the IC₉₀ of DGV-B and DGV-C in the same conditions mentioned above and washed for total protein extraction. The kit employs a two-site sandwich ELISA technique, where capture antibodies that specifically recognize the target kinases detected by the assay have been pre-spotted into each well of the microplate. Controls and experimental samples were added and both unphosphorylated and phosphorylated forms of the target kinases present in the samples are bound by the immobilized antibodies. Proteins were incubated overnight on the kit microplate and after that the microplate wells were washed to remove unbound proteins followed by incubation with a cocktail of phospho-specific biotinylated detection antibodies included in the kit. Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents were applied and a signal was produced at each

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

capture spot corresponding to the amount of phosphorylated protein bound. Following the manufacturer instructions, the microplate was read using the ChemiDoc XRS+ image capturer (Bio-Rad).

2.5. Data analysis

The Fiji software (ImageJ) (Schindelin et al., 2012) was used to quantify the pixel density obtained in the Human Apoptosis Array Proteome Profiler™. Whereas the Q-View software (Quansys Biosciences, Utah, USA) was used to measure the pixel density in the case of the Human Phospho-Kinase Array 1 Proteome Profiler™. All the statistical analyses were performed with the Sigma Plot 12.0 statistical analysis software (Systat Software, San Jose, CA, USA). Only the results showing differences with the control with p-values between $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered for the study. In addition, protein homology analyses were carried out for each of the detected proteins comparing between *Homo sapiens* and *Leishmania donovani* sequences using the geneDB and BLAST® analysis. The high-scoring segment pairs (HSP) is a subsegment of a pair of sequences, either nucleotides or amino acids, that share high level of similarity; and p is the probability that the alignment occurs by chance (the closer p value is to zero, the greater significance that this alignment presents).

3. Results

3.1. Effect of DGV-B and DGV-C in the expression of apoptotic proteins on *L. donovani*

After the membranes were developed, pixel quantification was done in order to obtain the graphs and continue with the statistical analysis of the relative values of expression of the different apoptotic proteins included in the Human Apoptosis Array. Membranes are shown in Fig. 1.

Results for the incubation of *L. donovani* with the IC₉₀ of DGV-B are shown in Fig. 2A. Five proteins presented differences when compared to the untreated parasites in their relative expression. The first one was a decrease in Bcl-x levels, protein which belongs

to the Bcl family which is a mitochondrial transmembrane protein responsible for avoiding the release of mitochondrial material to the cytosol, in a similar way such as cytochrome c (Billen et al., 2008). Therefore, it is an anti-apoptotic protein, and its decrease would indicate mitochondrial pore formation with the later release of mitochondrial material to the cytosol and loss of the mitochondrial membrane potential. After comparison between the amino acids sequence of this protein from *Homo sapiens* with the one from *L. donovani* in the database, a 38% homology (LdBPK_101320.1.1.pep, HSP 54, $p = 0.14$) was observed. Thus, it is the first time that Bcl-x is described in *Leishmania* genus, and also is the first report of a molecule, DGV-B, that acts decreasing the levels of Bcl-x in *L. donovani*. The second observation was the decrease of HO-1/HMOX1/HSP32 (heme-oxygenase 1) levels, which is an enzyme that presents anti-apoptotic, anti-inflammatory, cytoprotective and anti-oxidant activities (modifying the redox potential by degrading the heme group increasing bilirubin concentration) (Maines, 2005). Therefore, its decrease would result in a lower capacity of the parasite to resist reactive oxygen species formation. Moreover, the levels of HTRA2/Omi also decreased. This protein is a mitochondrial serine protease which binds to caspase inhibitors, as it presents similarities with the inhibitory apoptosis family of proteins (IAP) (Van de Walle et al., 2008). This pro-apoptotic protein has not been described in *Leishmania* genus so far, however when studying the amino acids sequences a 27% (LdBPK_040710.1.1.pep, HSP 79, $p = 0.34$, PKc-like superfamily) of homology against the human one was observed. Another obtained result was a decrease in phospho-p53 (S46) levels, a protein activated by phosphorylation on the S46. P53 is a tumor suppressor protein which is activated by DNA damage or cell cycle arrest in drug-treated cells (Liu et al., 2013). If the DNA damage is unreparable, p53 induces the activation of pro-apoptotic proteins. Although this protein has not been described in *Leishmania* genus, when studying the amino acids sequences a 42% (LdBPK_311320.1.1.pep, HSP 77, $p = 0.55$, p53 superfamily) of homology compared to the human one was observed. There was also an increase of SMAC/Diablo levels, these mitochondrial proteins are released to the cytosol during apoptosis, and present the same function as HTRA2/Omi. Thus, the proteins bind and inhibit the

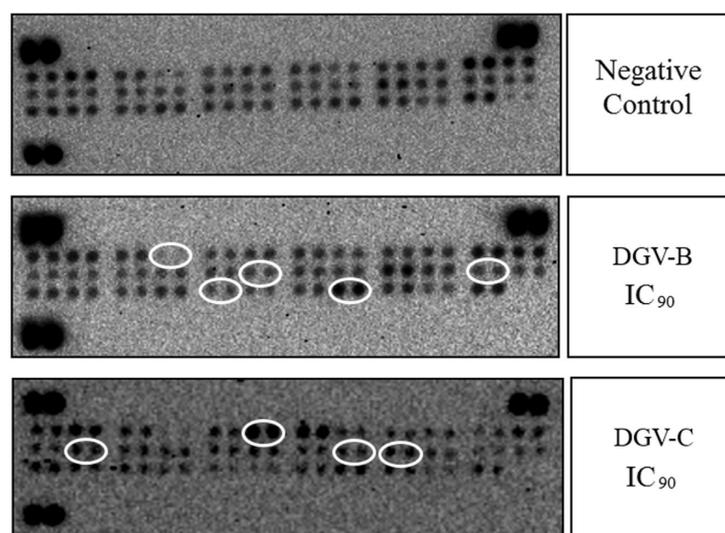


Fig. 1. Human Apoptosis Array membranes for *L. donovani*, control and treatment with DGV-B and DGV-C.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

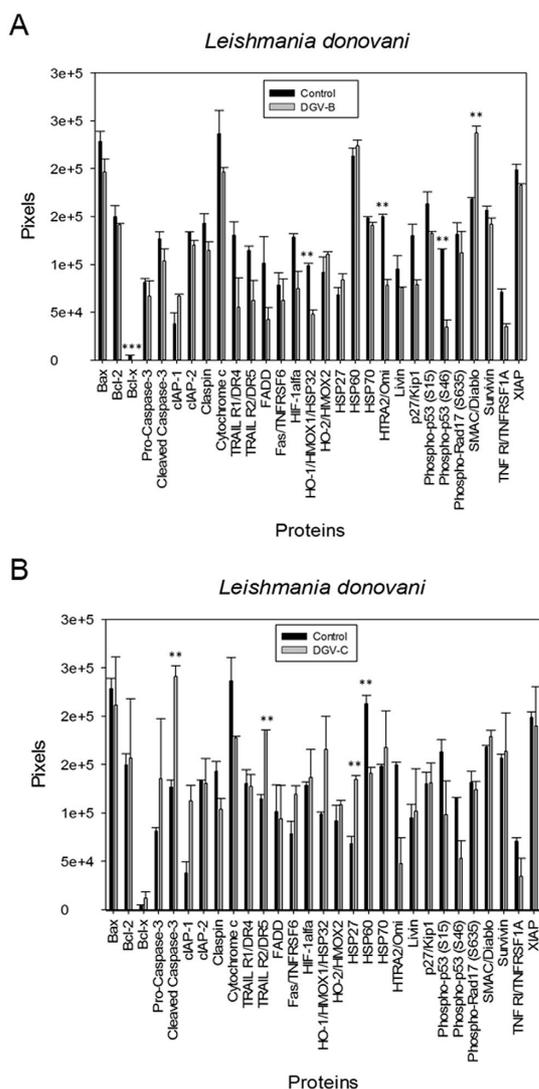


Fig. 2. A) Changes in the relative expression of apoptotic proteins on *L. donovani* after 24 h of incubation with the IC₉₀ of DGV-B. B) Changes in the relative expression of apoptotic proteins on *L. donovani* after 24 h of incubation with the IC₉₀ of DGV-C. Error bars represent the standard deviation (SD).

inhibitory apoptosis family of proteins (IAP), contributing to the apoptotic process (Bai et al., 2014). This protein has not been described in *Leishmania* genus, but when studying the amino acids sequences a 33% (LdBPK_262690.1.1..pep, HSP 72, $p = 0.23$, Smac_DIABLO specific hit) of homology compared the human one was observed.

Results for the incubation of *L. donovani* with the IC₉₀ of DGV-C are shown in Fig. 2B. Four proteins presented differences with the untreated parasites in their relative expression. The first one was an increase in the cleaved-caspase-3 levels, which is a cysteine aspartic protease (active form), a key protein in the apoptotic process (Nicholson, 1999). Another result was the increase of TRAIL R2/DR5 levels (TNF-related apoptosis-inducing ligand), a

membrane receptor member of the TNF (Tumoral Necrosis Factor) superfamily of receptors, which contains an intracellular domain which cellular function is signal transduction to induce apoptosis (Oikonomou and Pintzas, 2013). The homology studies revealed a 24% (LdBPK_110010.1.1..pep, HSP 63, $p = 0.90$) of similarity with its human homologue sequence. There was also an increase in Hsp27 levels, a heat-shock protein that belongs to the Hsp family, which main function is a chaperone activity, thermotolerance, growth regulation and cellular differentiation (Folgueira and Requena, 2007). Another heat-shock protein, the Hsp60 showed lower levels after treatment. This protein is involved in mitochondrial protein transport. Hsp60 is related to the apoptotic process by creating complexes with apoptotic responsible proteins, so it presents anti-apoptotic activity (Folgueira and Requena, 2007).

3.2. Effect of the DGV-B in the phosphorylation of different kinases on *L. donovani*

After incubation of *L. donovani* with the IC₅₀ and IC₉₀ of DGV-B and DGV-C, two proteins presented differences in their relative expression, compared to the untreated parasites, just in the treatment with DGV-B. The treatment caused a decrease in the phosphorylation levels of JNK Pan Specific (double phosphorylation of T183/Y185) and Src (phosphorylation of Y416) (Fig. 3). Src has been described as an oncogene, overexpressed in a wide variety of tumors. Moreover, Src acts together with FAK setting complexes for

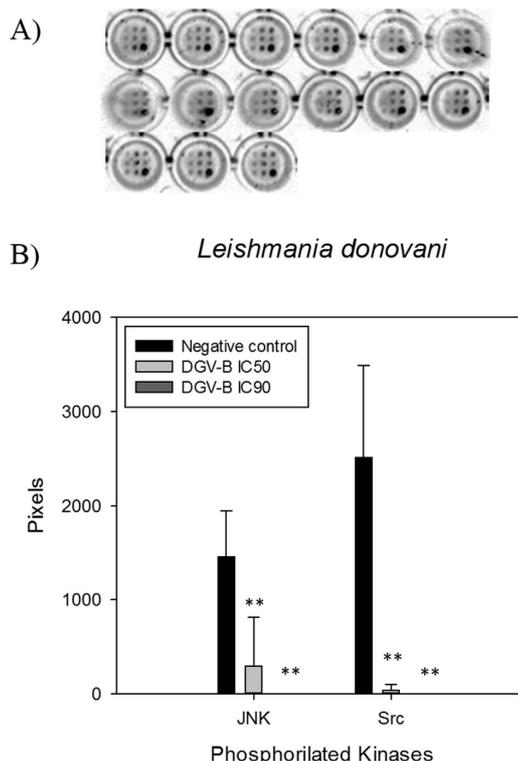


Fig. 3. A) Human Phospho-kinase Array 1 plate for *L. donovani*, control and treatment with DGV-B and DGV-C. B) Changes in the relative expression of phosphorylated-kinases on *L. donovani* after 24 h of incubation with the IC₉₀ of DGV-B. Error bars represent the standard deviation (SD).

signal transduction in cell survival processes (Ziemka-Natecz and Zalewska, 2007). JNK regulates several cellular processes including proliferation, survival and apoptosis, where persistent activation of JNK is related to cancer development and progression (Bubici and Papa, 2014). Although Src and JNK have not been described in *Leishmania* genus, when the amino acids alignments between human and *L. donovani* were analyzed a 30% (LdBPK_050390.1.1..pep, HSP 274, $p = 2.9 \times 10^{-22}$, STKc_Src specific hit) and a 38% (LdBPK_191480.1.1..pep, HSP 581, $p = 4.4 \times 10^{-58}$, STKc-JNK specific hit) of homology was observed, respectively.

4. Discussion

The two tested hexaazatrinaphthylenes included in this study, DGV-B and DGV-C, showed an induction of an apoptotic-like process at a very low doses against the promastigote stage of two strains of *Leishmania* (*L. amazonensis* and *L. donovani*). The gathered evidences of induced programmed cell death in *Leishmania* caused by these two molecules included: nuclear chromatin condensation, DNA fragmentation, mitochondrial transmembrane potential loss and phosphatidylerine exposure among others (López-Arencibia et al., 2015).

Considering the results for the *Human Apoptosis Array* in the case of *L. donovani* treated with DGV-B, a decrease in Bcl-x, HTRA2/Omi, phospho-p53 (S46), H0-1/HMOX1/HSP32, and an increase in SMAC/Diablo levels were observed. Although Bcl-x has not been described in *Leishmania* genus, one study carried out by Alzate et al. demonstrated that the expression of *Bcl-xl* in *Leishmania* promastigotes protects parasites against mitochondrial membrane depolarization and, in general, against all processes associated to programmed cell death (Alzate et al., 2006). HMOX-1 has been already described in *Leishmania* genus, and as well as many other drugs like amphotericin B, allopurinol or pentamidine, when incubated with *L. donovani* it induces a decrease in the activity of HMOX-1 (Srivastava et al., 1997). Taken this together with the alterations in the two mitochondrial enzymes SMAC/Diablo and HTRA2/Omi, released in apoptotic processes, and added to the p53 levels changes, it would be possible to assume that the DGV-B molecule induces a programmed cell death process by the intrinsic pathway in *L. donovani* (Fig. 4).

In the case of incubation of *L. donovani* with DGV-C, the obtained

results for the *Human Apoptosis Array* revealed an increase in cleaved-caspase-3, TRAIL R2/DR5, Hsp27, and a decrease in Hsp60 levels. Although any classical caspase gene has not been identified in *Leishmania* genus so far, it is known that *Leishmania* expresses metacaspases, a close family of proteases with caspase-like activity. These proteins could have been detected by the array. Despite the low homology levels observed for TRAIL R2/DR5, the protein was detected on the array, so it would suggest that regions of this protein must be highly conserved in eukaryotes. The chaperon Hsp27, in relation with the apoptosis presents the ability to inhibit some of its processes, such as to block the cytochrome c release from the mitochondria, or to block the activation of caspase-3 (Nahomi et al., 2015). However, in recent studies the pro-apoptotic activity of this protein has been reported, as it is able to induce cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cells (Guo et al., 2015). The sHsp (small-Hsp) from kinetoplastids, where Hsp27 is included, are activated after stress conditions (Folgueira and Requena, 2007). Otherwise, it is known that *L. donovani* presents two Hsp60 (cpn60.1 y cpn60.2), with anti-apoptotic activity, and are situated in the mitochondrial matrix (Schlüter et al., 2000). Taken these results together, DGV-C molecule could induce a programmed cell death process by activation of the extrinsic pathway (Fig. 4).

Regarding the obtained results for the *Human Phospho-Kinase Array 1*, a decrease in Src and JNK phosphorylation levels after DGV-B treatment was observed. Src autophosphorylation in Y416 position causes the activation of this oncogene (Brown and Cooper, 1996). Besides, JNK double phosphorylation in T183 and Y185 positions also cause the activation of the enzyme (Bubici and Papa, 2014). Therefore, a decrease in the phosphorylation levels of these two proteins is directly related to proliferation processes, thus reducing the regular activity of these enzymes blocking cell survival and proliferation.

5. Conclusions

All the observed results were indicative of the cell death process that the treated parasites were undergoing. However, is still necessary to clarify which proteins are present in *Leishmania* parasites since the majority of the analyzed proteins in this study have not even been described in *Leishmania* genus. Additionally, it is

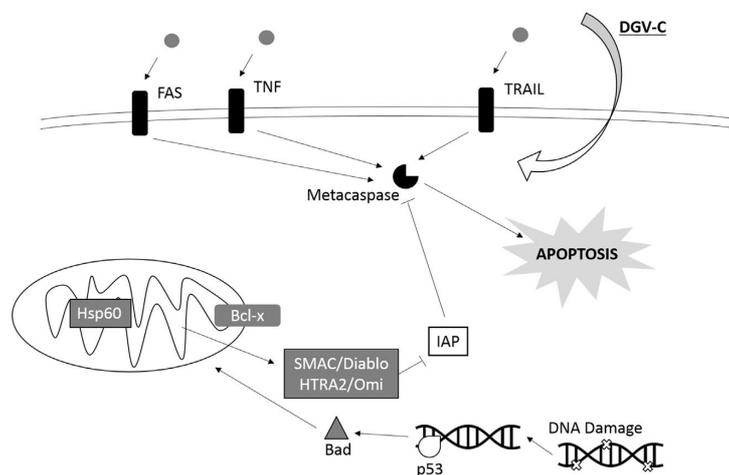


Fig. 4. Proposed programmed cell death pathways for DGV-B and DGV-C on *L. donovani*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

apparent that bioinformatics alone is inadequate and biochemical characterisation is required in order to further demonstrate the observations in this study. Nevertheless, the obtained results highlight the potential therapeutic use of hexaazatrinaphthylene derivatives against *Leishmania* species and further studies should be undertaken to establish them as novel leishmanicidal therapeutic agents and also to check the potential application of these arrays to study the host response to drug-treated *Leishmania* parasites.

Acknowledgments

This work was supported by the grants (project no. RD12/0018/0012 of the programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain and PI13/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III. ALA was funded by a grant "Ayudas del Programa de Formación de Personal Investigador, para la realización de Tesis Doctorales" from the Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información from the Canary Islands Government. MRB and ALA were funded by Becas de Investigación Obra Social La Caixa-Fundación CajaCanarias para Posgraduados de la Universidad de La Laguna. Convocatoria 2014. JLM was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Science and Innovation RYC-2011-08863. IS was supported by a grant from the Laboratoire Matériaux- Molécules et Applications, IPEST, and Ayudas para estancias estudiantes de posgrado e investigadores del continente americano y africano 2014 from the ULL.

References

- Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P., 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 61, 223–274.
- Alzate, J.F., Alvarez-Barrientos, A., González, V.M., Jiménez-Ruiz, A., 2006. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* 11 (2), 161–171.
- Bai, L., Smith, D.C., Wang, S., 2014. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 144 (1), 82–95.
- Beierle, E.A., Ma, X., Stewart, J., Nyberg, C., Trujillo, A., Cance, W.G., et al., 2010. Inhibition of focal adhesion kinase decreases tumor growth in human neuroblastoma. *Cell Cycle* 9 (5), 1005–1015.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., Andrews, D.W., 2008. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 10 (6(6)), e147.
- Boelaert, M., Criel, B., Leeuwenburg, J., Van Damme, W., Le Ray, D., Van der Stuyft, P., 2000. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 465–471.
- Brown, M.T., Cooper, J.A., 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287 (2–3), 121–149.
- Bubici, C., Papa, S., 2014. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* 171 (1), 24–37.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111–126.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- Folgueira, C., Requena, J.M., 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (4), 359–377.
- Golubovskaya, V., Nyberg, C., Zheng, M., Kweh, F., Magis, A., Ostrov, D., et al., 2008. A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J. Med. Chem.* 51 (23), 7405–7416.
- Guo, Y., Ziesch, A., Hocke, S., Kampmann, E., Ochs, S., De Toni, E.N., et al., 2015. Overexpression of heat shock protein 27 (Hsp27) increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells through S-phase arrest and apoptosis. *J. Cell Mol. Med.* 19 (2), 340–350.
- Heffler, M., Golubovskaya, V.M., Dunn, K.M., Cance, W., 2013. Focal adhesion kinase autophosphorylation inhibition decreases colon cancer cell growth and enhances the efficacy of chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* 14 (8), 761–772.
- Hepburn, N.C., 2000. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 25, 363–370.
- Hochwald, S.N., Nyberg, C., Zheng, M., Zheng, D., Wood, C., Massoll, N.A., et al., 2009. A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. *Cell Cycle* 8 (15), 2435–2443.
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., Feng, Z., 2013. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 28 (356(2 Pt A)), 197–203.
- López-Arencibia, A., García-Velázquez, D., Martín-Navarro, C.M., Sifaoui, I., Reyes-Battle, M., Lorenzo-Morales, J., et al., 2015. In vitro activities of hexaazatrinaphthylenes against *Leishmania* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (5), 2867–2874.
- Maines, M.D., 2005. The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid. Redox Signal* 7 (11–12), 1761–1766.
- Maltezou, H.C., 2010. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 617521.
- Nahomi, R.B., DiMauro, M.A., Wang, B., Nagaraj, R.H., 2015. Identification of peptides in human Hsp20 and Hsp27 that possess molecular chaperone and anti-apoptotic activities. *Biochem. J.* 465 (1), 115–125.
- Nicholson, D.W., 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6 (11), 1028–1042.
- O'Brien, T., Golubovskaya, V.M., Conroy, J., Liu, S., Wang, D., Liu, B., et al., 2014. FAK inhibition with small molecule inhibitor Y15 decreases viability, clonogenicity, and cell attachment in thyroid cancer cell lines and synergizes with targeted therapeutics. *Oncotarget* 5 (17), 7945–7959.
- Oikonomou, E., Pintzas, A., 2013. The TRAIL of oncogenes to apoptosis. *Biofactors* 39 (4), 343–354.
- Olliaro, P.L., 2010. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23, 595–602.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581–596.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), 676–682.
- Schlüter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C., et al., 2000. Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim. Biophys. Acta* 1491 (1–3), 65–74.
- Seifert, K., Croft, S.L., 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 73–79.
- Singh, B., Sundar, S., 2012. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30 (26), 3834–3842.
- Srivastava, P., Sharma, G.D., Kamboj, K.K., Rastogi, A.K., Pandey, V.C., 1997. Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol. Cell Biochem.* 171 (1–2), 65–68.
- Sundar, S., Sinha, P.K., Rai, M., Verma, D.K., Nawin, K., Alam, S., et al., 2011. Comparison of short-course multi-drug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 377, 477–486.
- Van de Walle, L., Lamkanfi, M., Vandenabeele, P., 2008. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* 15 (3), 453–460.
- WHO. World Health Organization: Leishmaniasis: Background Information, www.who.int.
- World Health Organization, 2009. Visceral Leishmaniasis Therapy: Statement on the Outcome of a Meeting. WHO, Geneva. Available at: http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish_VL_Therapy_statement.pdf (accessed 02.07.12.).
- Zheng, D., Golubovskaya, V., Kurenova, E., Wood, C., Massoll, N.A., Ostrov, D., et al., 2010. A novel strategy to inhibit FAK and IGF-1R decreases growth of pancreatic cancer xenografts. *Mol. Carcinog.* 49 (2), 200–209.
- Ziemka-Nalecz, M., Zalewska, T., 2007. Transient forebrain ischemia effects FAK-coupled signaling in gerbil hippocampus. *Neurochem. Int.* 51 (6–7), 405–411.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Perifosine Mechanisms of Action in *Leishmania* Species

AQ: au Atteneri López-Arencibia,^{a,b} Carmen Martín-Navarro,^b Ines Sifaoui,^c María Reyes-Battle,^b Carolina Wagner,^{b,d} Jacob Lorenzo-Morales,^b Sutherland K. Maciver,^a José E. Piñero^b

AQ: aff Centre for Integrative Physiology, Biomedical Sciences, Edinburgh Medical School, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom^a; University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain^b; Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia^c; Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Venezuela^d

ABSTRACT Here the mechanism by which perifosine induced cell death in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* is described. The drug reduced *Leishmania* mitochondrial membrane potential and decreased cellular ATP levels while increasing phosphatidylserine externalization. Perifosine did not increase membrane permeabilization. We also found that the drug inhibited the phosphorylation of Akt in the parasites. These results highlight the potential use of perifosine as an alternative to miltefosine against *Leishmania*.

KEYWORDS perifosine, *Leishmania*, activity, apoptosis-like

AQ: A *Leishmania* species are obligate intracellular parasites that are transmitted to the mammalian host by the bites of infected sand flies. Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form, is a group of diseases with a varied spectrum of clinical manifestations that range from small cutaneous nodules to wide mucosal tissue destruction. Visceral leishmaniasis (VL), characterized by prolonged fever and splenomegaly, is the most severe form, and it is often fatal if untreated (1).

The World Health Organization (WHO) estimates that 1.5 million cases of CL and 500,000 cases of VL occur every year in 82 countries. CL is endemic in more than 70 countries worldwide, and 90% of cases occur in Afghanistan, Algeria, Brazil, Pakistan, Peru, Saudi Arabia, and Syria. VL presents in 65 countries, and the majority (90%) of these cases occur in five countries, Bangladesh, India, Nepal, Sudan, and Brazil. Estimates indicate that there are approximately 350 million people at risk for acquiring leishmaniasis, with 12 million currently infected worldwide (1).

AQ: B
AQ: C The current available leishmanicidal treatments include pentavalent antimonials, amphotericin B, miltefosine, paramomycin, and pentamidine. These drugs can be administered alone or in combination with each other. However, these drugs are normally highly toxic, even at low doses. Furthermore, most of these treatments require several days of hospitalization because of their intravenous or parenteral manner of administration. The appearance of strains resistant to these active compounds presents a major problem for the current therapeutic measures against these parasites (2). Moreover, since there is no immediate prospect of a vaccine for leishmaniasis (3), there is an urgent need to develop novel leishmanicidal agents.

Several typical markers of mammalian apoptosis have been found in *Leishmania*, suggesting the existence of an apoptosis-like death in these organisms. The markers include cell shrinkage, nuclear chromatin condensation, DNA fragmentation, membrane blebbing, mitochondrial transmembrane potential loss, and phosphatidylserine exposure (4).

Received 4 October 2016 Returned for modification 17 November 2016 Accepted 8 January 2017

Accepted manuscript posted online 17 January 2017

Citation López-Arencibia A, Martín-Navarro C, Sifaoui I, Reyes-Battle M, Wagner C, Lorenzo-Morales J, Maciver SK, and Piñero JE. 2017. Perifosine mechanisms of action in *Leishmania* species. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02127-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02127-16>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Address correspondence to Atteneri López-Arencibia, atlopez@ull.edu.es.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

TABLE 1 Leishmanicidal activities, cytotoxicities, and SIs of the tested alkylphospholipids

Drug	Promastigote stage, IC ₅₀ (μM) (mean ± SD) (IC ₉₀ [μM]) against:		Amastigote stage, IC ₅₀ (μM) against	Cytotoxicity, CC ₅₀ (μM) against	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. amazonensis</i>	SI	J774A.1 cells
Perifosine	3.59 ± 0.15 (4.30)	1.98 ± 0.29 (4.52)	2.82 ± 1.64	23.1	65.14
Miltefosine	6.48 ± 0.24 (9.63)	3.32 ± 0.27 (5.15)	3.12 ± 0.30	23.2	72.19

Perifosine was purchased from Cayman Chemical, and miltefosine, used as reference drug, was provided by Æterna Zentaris. In this study, strains of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) and *Leishmania donovani* (MHOM/IN/90/GE1F8R) were used. The murine macrophage J774A.1 (ATCC TIB-67) cell line was also used to evaluate host cell toxicity.

For the activity assays against the promastigote stage of *Leishmania* spp., a colorimetric assay based on alamarBlue reagent (Invitrogen, Life Technologies) was used as previously described (5).

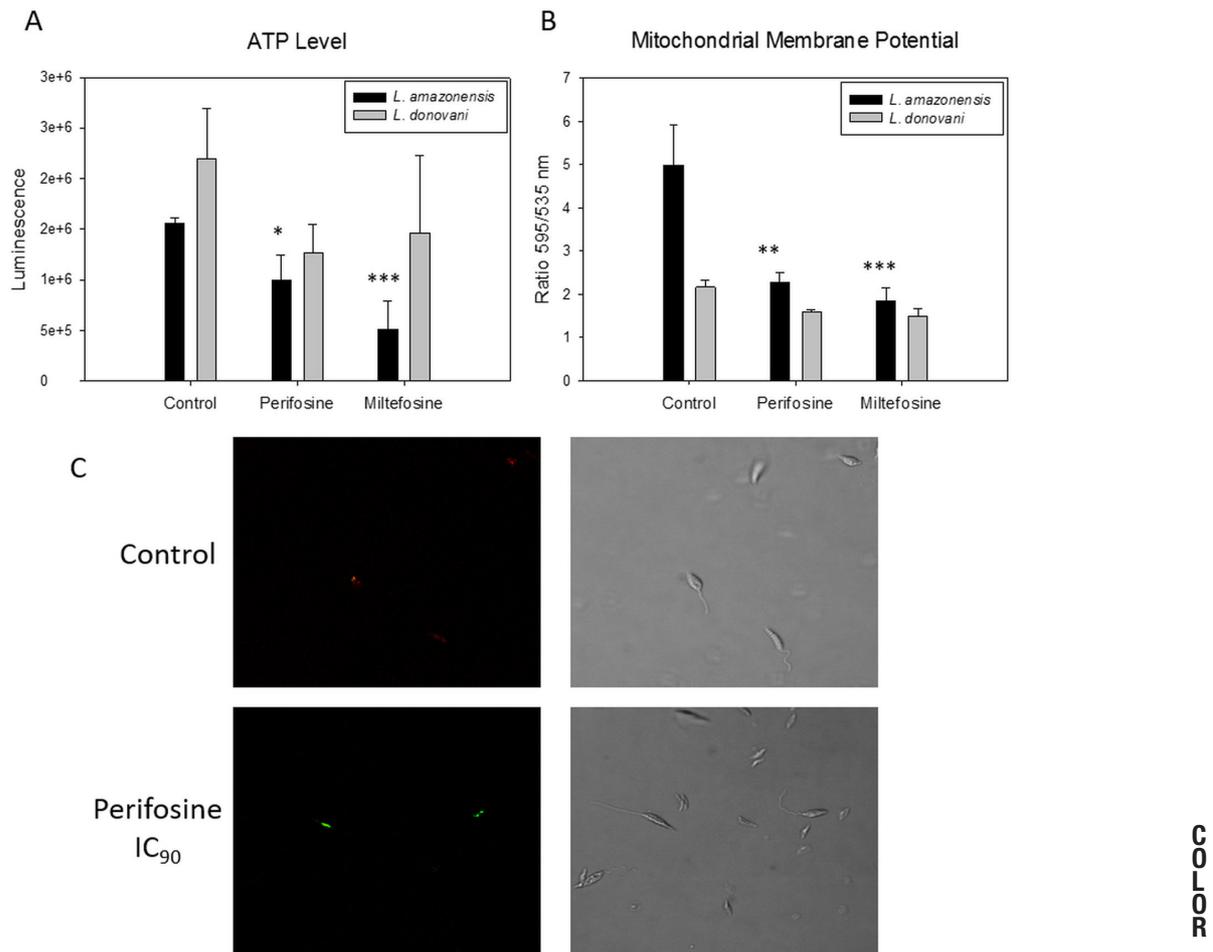


FIG 1 (A) ATP levels of *L. amazonensis* and *L. donovani* after 24 h of incubation with the IC₉₀s of perifosine and miltefosine. (B) Changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of *L. amazonensis* and *L. donovani* after 24 h of incubation with the IC₉₀ of perifosine and miltefosine. Error bars represent the standard deviation (SD). Each data point indicates the mean of three measurements. (C) Images of *L. amazonensis* incubated with JC-1 dye after 24 h of treatment with the IC₉₀ of perifosine; images of negative controls of parasites without treatment are shown on the upper left and upper right.

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

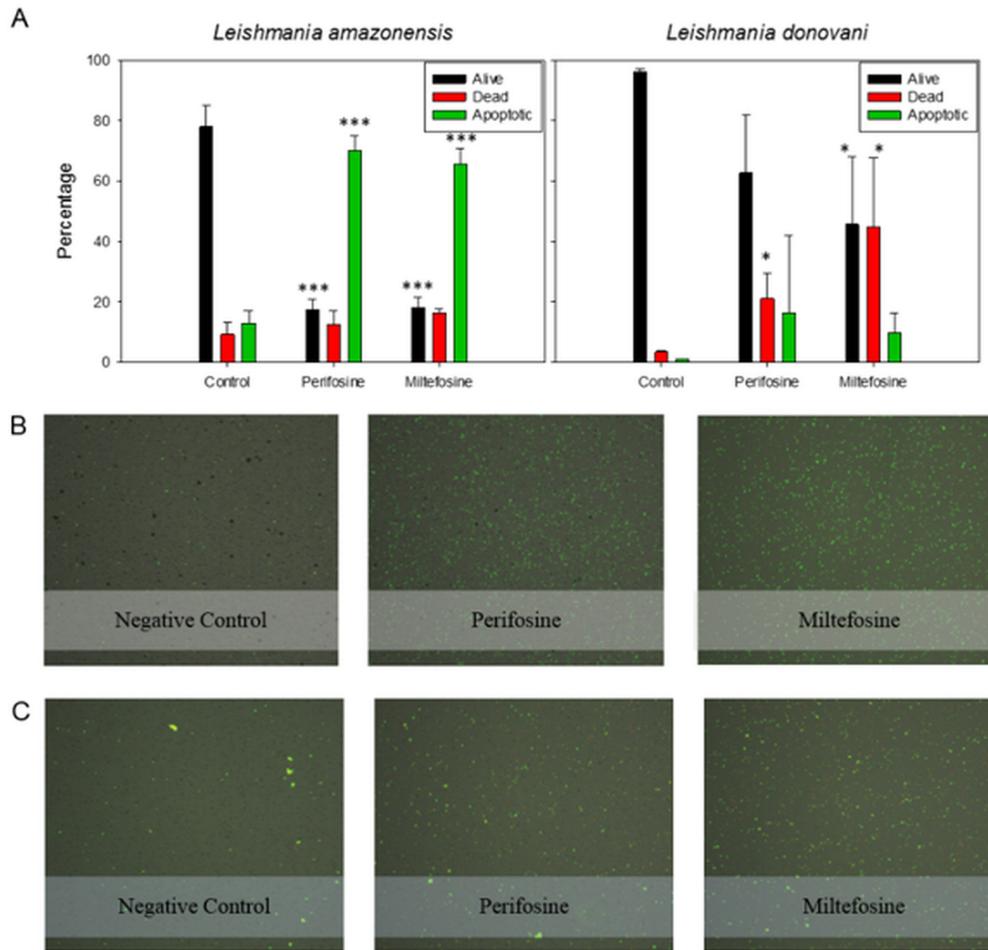


FIG 2 (A) Results of phosphatidylserine exposure after 48 h of incubation with the IC₉₀s of perifosine and miltefosine. Error bars represent the standard deviation (SD). Each data point indicates the mean of three measurements. Images of *L. amazonensis* (B) and *L. donovani* (C) captured using a Tali image-based cytometer.

Activity assays against intracellular amastigotes were performed as previously described with minor modifications (6). For the toxicity assay, an LDH cytotoxicity detection kit (Roche Applied Science) was used (7). The results against the promastigote and intracellular amastigote stages are shown in Table 1, as are the cytotoxicities and selectivity indexes (SIs). The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s) are consistent with data obtained in previous studies (5, 8). A study by Glaser et al. (9) showed similar cytotoxicity data for miltefosine.

For measuring changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of *L. amazonensis* and *L. donovani*, the JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit (Cayman Chemical) was used. The ratio of the reading at 595 nm to the reading at 535 nm was considered the relative $\Delta\Psi_m$ value (10). The two molecules induced decreases in the $\Delta\Psi_m$ in both parasitic strains; the decrease was greater in the case of *L. amazonensis* (Fig. 1).

ATP levels were measured using the Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay (Promega). This assay proved the strong effects of miltefosine and perifosine in decreasing ATP levels (Fig. 1). The apoptosis-like process in *Leishmania* spp. requires ATP to carry out all the involved procedures; however, it seems that ATP levels are

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

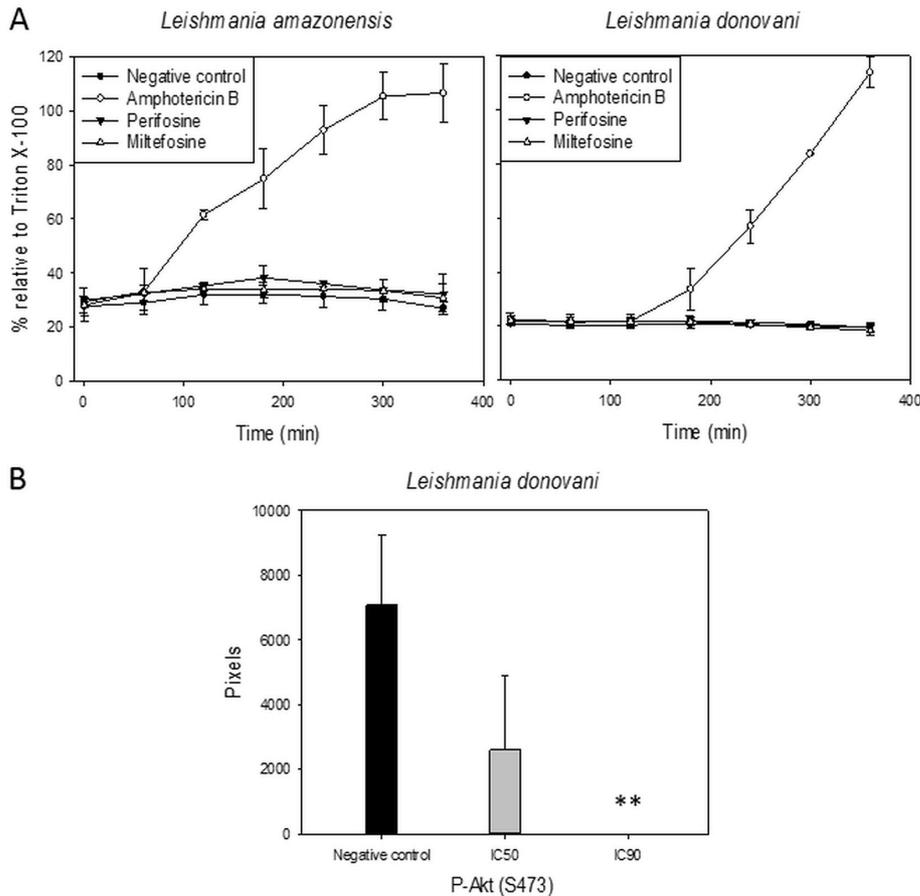


FIG 3 (A) Plasma membrane permeability assay results for *L. amazonensis* and *L. donovani*. Triton X-100 was added to obtain 100% permeabilized cells, and amphotericin B (10 μ M) was used as positive control. (B) Changes in the relative expression of phosphorylated kinases on *L. donovani* after 24 h of incubation with the IC₉₀ of perifosine. Error bars represent the standard deviation (SD). Each data point indicates the mean of three measurements.

maintained by either glycolysis and/or minimal mitochondrial activity to support the parasite metabolism until the conclusion of the apoptosis-like process (11).

F2

The Tali apoptosis kit (annexin V Alexa Fluor 488 and propidium iodide) (Life Technologies) double-staining assay was performed according to manufacturer instructions using a Tali image-based cytometer. Figure 2 shows all the obtained results. Moreover, the differences in the amounts of annexin V observed between the two strains of *Leishmania* (amounts were greater in *L. amazonensis*) might have been due to differences in the amount of polysaccharides (PSs) present in the membrane of the parasites (12).

F3

Plasma membrane permeability was measured using SYTOX Green (Molecular Probes). The results confirmed that the plasma membrane integrity was not altered in the treated parasites, at least not in the first 6 h of treatment (Fig. 3). This provided us with important data with which to distinguish between apoptosis and necrosis, considering the rupture of the plasma membrane, which is a morphological feature of necrosis (13). Also, this assay might indicate that the target of these molecules is not likely to be primarily the plasma membrane of the parasites (14).

The Human Phospho-Kinase Array 1 proteome profiler (R&D Systems) was used for the phosphorylation analysis of different kinases during the promastigote stage and

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

was developed by chemiluminescence using ChemiDoc XRS+ image capture (Bio-Rad). The Q-View software (Quansys Biosciences) was used to measure pixel density. All statistical analyses were performed with Sigma Plot 12.0 (Systat Software). After incubation of *L. donovani* with perifosine, one protein presented a difference in its relative expression, that is, a decrease in the phosphorylation levels of Akt (phosphorylation of S473), which is necessary for its activation (Fig. 3). Miltefosine is an inhibitor of Akt in *Leishmania* (15), and perifosine also inhibits Akt protein in human cancer cells (16). These facts lead us to believe that perifosine has the same Akt-inhibiting capacity in *Leishmania*, which leads to the induction of an apoptosis-like cell death that is known to occur with miltefosine in *L. amazonensis* (17) and *L. donovani* (18).

Previous results obtained in our laboratory on alkylphospholipids showed that perifosine was superior to miltefosine and edelfosine in killing *Leishmania* promastigotes *in vitro* (5), and we also showed that perifosine was superior to other alkylphospholipids in an *in vivo* mouse model (19). We now conclude that perifosine induces an apoptosis-like process in *L. amazonensis* and *L. donovani* at very low doses, which makes perifosine a promising candidate for further study and possible therapeutic use in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the RICET grants (project RD12/0018/0012 of the program of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain; PI13/00490 "Protozoosis Emergentes por Amebas de Vida Libre: Aislamiento, Caracterización, Nuevas Aproximaciones Terapéuticas y Traslación Clínica de los Resultados" from the Instituto de Salud Carlos III; and Project BIO24 "Principios activos inductores de apoptosis en la quimioterapia de tripanosomosis y leishmaniasis" (project 2016_25) from Obra Social La Caixa-Fundación CajaCanarias. A.L.-A. was funded by a grant from "Fundación Canaria Doctor Manuel Morales" and the Agustín de Betancourt Programme, and J.L.-M. was supported by the Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant RYC-2011-08863).

REFERENCES

- World Health Organization. 2016. Leishmaniasis: background information. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19:111–126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>.
- Singh B, Sundar S. 2012. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30:3834–3842. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.068>.
- Bruchhaus I, Roeder T, Renneberg A, Heussler VT. 2007. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol* 23:376–383. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.004>.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero JE. 2007. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res* 100:1155–1157. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0408-4>.
- Jain SK, Sahu R, Walker LA, Tekwani BL. 2012. A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *J Vis Exp* 30:pil1 4054.
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Santana-Morales MA, Afonso-Lehmann RN, Maciver SK, Valladares B, Martínez-Carretero E. 2010. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:5151–5155. <https://doi.org/10.1128/AAC.00329-10>.
- Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81:151–157. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00197-8).
- Glaser J, Schultheis M, Hazra S, Hazra B, Moll H, Schurig U, Holzgrabe U. 2014. Antileishmanial lead structures from nature: analysis of structure-activity relationships of a compound library derived from caffeic acid bornyl ester. *Molecules* 19:1394–1410. <https://doi.org/10.3390/molecules19021394>.
- Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, Ticona JC, Reyes-Battle M, Mejri M, Jiménez AI, Lopez-Bazzocchi I, Valladares B, Lorenzo-Morales J, Abderabba M, Piñero JE. 2014. *In vitro* effects of triterpenic acids from olive leaf extracts on the mitochondrial membrane potential of promastigote stage of *Leishmania* spp. *Phytomedicine* 21:1689–1694. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.004>.
- Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. 2002. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 277:24717–24727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201961200>.
- López-Arencibia A, García-Velázquez D, Martín-Navarro CM, Sifaoui I, Reyes-Battle M, Lorenzo-Morales J, Gutiérrez-Ravelo A Piñero JE. 2015. *In vitro* activities of hexaazatrinaphthylenes against *Leishmania* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2867–2874. <https://doi.org/10.1128/AAC.00226-15>.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 16:3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>.
- Bou DD, Tempone AG, Pinto EG, Lago JH, Sartorelli P. 2014. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine* 21: 676–681. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.004>.
- Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. 2012. Miltefosine: a

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

- review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67:2576–2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>.
16. Fensterle J, Aicher B, Seipelt I, Teifel M, Engel J. 2014. Current view on the mechanism of action of perifosine in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 14:629–635. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140309225912>.
 17. Marinho Fde A, Gonçalves KC, Oliveira SS, Oliveira AC, Bellio M, d'Avila-Levy CM, Santos AL, Branquinha MH. 2011. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:507–509. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400021>.
 18. Verma NK, Dey CS. 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3010–3015. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004>.
 19. Cabrera-Serra MG, Valladares B, Piñero JE. 2008. *In vivo* activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 108:20–25. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.08.005>.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

AQau—Please confirm the given-names and surnames are identified properly by the colors.

■ = Given-Name, ■ = Surname

AQaff—Please confirm the following full affiliations or correct here as necessary. This is what will appear in the online HTML version:

^aCentre for Integrative Physiology, Biomedical Sciences, Edinburgh Medical School, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom

^bUniversity Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Canary Islands, Spain

^cLaboratoire Matériaux-Molécules et Applications, University of Carthage, La Marsa, Tunisia

^dCátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Venezuela

AQaff—This affiliation line will appear in the PDF version of the article and matches that on page 1 of the proof; corrections to this affiliation line may be made here **or** on page 1 of the proof:

Centre for Integrative Physiology, Biomedical Sciences, Edinburgh Medical School, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom^a; University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, University of La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain^b; Laboratoire Matériaux-Molécules et Applications, IPEST, University of Carthage, La Marsa, Tunisia^c; Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Venezuela^d

AQfund—The Funding Information below includes information that you provided on the submission form when you submitted the manuscript. This funding data will not appear in the manuscript, but it will be provided to CrossRef in order to make the data publicly available.

Therefore, please check it carefully for accuracy and mark any necessary corrections. Statements acknowledging financial support may also appear within the manuscript itself (in Acknowledgments); any such statements should also be checked for accuracy, but will have no bearing on funding data deposited with CrossRef.

Funder	Grant(s)	Author(s)	Funder ID
Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)	PI13/00490	Carmen María Martín-Navarro, Jose Enrique Piñero, Ines Sifaoui, Atteneri López-Arencibia, Maria Reyes-Battle, Carolina Wagner, Jacob Lorenzo-Morales	

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

2

Obra Social La Caixa- Fundación CajaCanarias	2016_25	Jose Enrique Piñero, Maria Reyes-Battle, Carolina Wagner, Jacob Lorenzo-Morales
Ramón y Cajal Subprogramme from the Spanish Ministry of Science an Innovation	RYC-2011-08863	Jacob Lorenzo-Morales
Redes Temáticas de Investigación Cooperativa	RD12/0018/0012	Carmen María Martín-Navarro, Jose Enrique Piñero, Maria Reyes-Battle, Jacob Lorenzo-Morales
Fundación Canaria Dr. Manuel Morales		Atteneri López-Arencibia

AQA—Please edit for clarity; CL is the most common form of what?

AQB—Is “paramomycin” correct, or should it be “paromomycin” instead?

AQC—Please verify the addition of “with each other” or edit as necessary to clarify with what other meds these drugs could be combined.

AQD—In Table 1, please verify that the mean and SD are meant, or edit the heading as necessary for accuracy.

AQE—Please verify or correct the expansion of IC₅₀ and all other abbreviations in the article.

AQF—Please verify edits to the “After incubation of...” sentence, or edit further if necessary.

AQG—Is the change to “Akt-inhibiting capacity” okay/still as meant?

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Artículos

C. Guzmán de R

guzman.carmen@gmail.com
Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

A. Nessi P

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

H. González O

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

M.O. Hernández

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

M. Galindo

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

A. Dorta

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

C. Wagner

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

M.A. Vethencourt

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

M.V. Pérez de G

Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

■ **Balantidium spp en cerdos y sus criadores: Prevalencia en comunidades de dos Estados de Venezuela.**

■ [Introducción](#)

■ [Materiales y métodos](#)

■ [Resultados](#)

■ [Discusión](#)

■ [Referencias](#)

Parasitología**Balantidium spp en cerdos y sus criadores: Prevalencia en comunidades de dos Estados de Venezuela.**

Fecha de recepción: 22/01/2013
Fecha de aceptación: 12/03/2013

Balantidium coli, es el único protozoo ciliado que parasita al hombre. Infecta diferentes animales, entre ellos al cerdo, el cual además es infectado por *B. suis* que es morfológicamente idéntico. Se plantea que el cerdo es la fuente de infección para el humano, existiendo controversias al respecto. Para determinar la prevalencia de *Balantidium spp* en cerdos y humanos, se estudiaron 72 cerdos, 60 criados en granjas, 12 criados domésticamente y 51 personas que los manipulaban. El estudio parasitológico se realizó mediante examen microscópico directo, métodos de concentración, cultivos y coloraciones especiales. *Balantidium spp* se identificó en 65% y 67% de los cerdos criados en granjas y domésticamente, respectivamente. También se detectó otros protozoarios y helmintos. No se encontró infección con *Balantidium spp* en los criadores de cerdos, sugiriendo que *B. suis* podría ser la especie que prevalece en este grupo de animales examinados.

Palabras Claves: *Balantidium*; prevalencia; Venezuela; zoonosis; cerdos

Title

Balantidium spp in pigs and their keepers: prevalence in communities in two states of Venezuela.

Abstract

Balantidium coli is the only ciliated protozoan that infects humans. It can also infect pigs, these can also be infected by *B. suis*. Which is morphologically identical to *B. coli*. It has been suggested that pigs are the source for human infections, even though this remain controversial. To determine *Balantidium spp* prevalence in pigs and humans, we evaluated 51 pig farmers and 72 pigs: 60 farm-raised and 12 domestically bred. The parasitological study was performed by direct examination, concentration methods, cultures and specific stains. *Balantidium spp* was identified in 65% and 67% of farm reared pigs and domestically raised pigs, respectively. We also detected other protozoa and helminths. There was no *Balantidium spp* infection in pigs keepers, so we suggested that *B. suis* appears to be prevalent in these animals.

Key Word

Balantidium; prevalence; Venezuela; zoonoses; pigs

Balantidium spp en cerdos y sus criadores: Prevalencia en comunidades de dos Estados de Venezuela.

http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=4767&rv=107

07/05/2013

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: qlm4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Introducción

Las infecciones por protozoarios intestinales son las de mayor prevalencia en el mundo, pudiendo encontrarse entre 40-70% en los países subdesarrollados, principalmente debido a las deficientes condiciones higiénico-sanitarias y bajo nivel sociocultural⁽¹⁻³⁾. El género *Balantidium* (Claparede y Lachmann, 1858)⁽²⁾, incluye a protozoarios ciliados observados en el intestino de ranas, jabalíes, ovejas, caballos, bovinos, aves, peces, tortugas, cucarachas y otros. En el hombre este ciliado fue descrito por Malmsten en 1957, quien lo observó y describió en dos pacientes con disentería aguda, denominándolo *Paramecium coli* por su parecido al ciliado de vida libre. Leukart en 1861, describió un ciliado idéntico en el cerdo y Stein en 1863, pensó que el ciliado descrito por Leukart y el descrito por Malmsten en el humano, eran morfológicamente idénticos, por lo cual los designó como *Balantidium coli*⁽²⁻⁶⁾. En el cerdo, fueron descritas dos especies, *B. coli* y *B. suis*, por Mc Donald en 1922, las cuales según sus observaciones, diferían en forma, tamaño, características del citostoma y macronúcleo, lo cual fue considerado posteriormente por otros autores como una misma especie y que tales variaciones dependían de la cantidad de almidón ingerido del medio por el ciliado⁽⁴⁾. Hasta ahora, *B. coli* es el único protozoario ciliado que se ha encontrado infectando al hombre, principalmente en el intestino grueso y su transmisión es por vía oro-fecal a partir de las heces del hospedador infectado^(1-3,5). Se ha propuesto que las especies *B. suis* de los cerdos y *B. struthionis* de avestruces son sinónimos de *B. coli*, pero aunque se ha encontrado un polimorfismo genético en aislados de cerdo y del avestruz, su relevancia taxonómica no ha sido establecida^(7,8). Entre los factores descritos que favorecen la balantidiosis en humanos se encuentran: el contacto estrecho entre cerdos y humanos, la disposición inadecuada de las heces, contaminación de las fuentes de agua potable y de los cultivos de vegetales con heces humanas y de animales, así como las condiciones climáticas en las regiones tropicales y subtropicales^(1-3,5). La balantidiasis tiene una distribución cosmopolita y las prevalencias reportadas a escala mundial son tan variables que oscilan entre 0- 28% en el hombre, siendo más frecuente en el cerdo con prevalencias entre 33-94,76%, por lo cual se considera que éste es la principal fuente de infección para el hombre^(5,9-13).

Los resultados de los estudios donde se asocia la prevalencia de balantidiosis humana con la actividad laboral o contacto estrecho con cerdos, son controversiales, ya que hay lugares como Nueva Guinea, donde la tasa de infección entre los trabajadores de granjas porcinas alcanza un 28% y en otros como Canadá y Estados Unidos, donde las condiciones climáticas son extremas, la infección humana por este protozoario es poco frecuente. En otras regiones como Egipto, la exposición del hombre a los cerdos y la prevalencia de balantidiasis humana son bajas^(1,3,5,9-11). La poca prevalencia en el hombre se ha tratado de investigar realizando estudios de infección cruzada, encontrándose que el humano es refractario a la infección por aislados provenientes de cerdos^(5,11,14,15). Por otra parte, en lugares donde no hay contacto con cerdos, como instituciones al cuidado de enfermos mentales, prisiones y orfanatos, se han registrado brotes de balantidiasis en los cuales la transmisión ha sido asociada con el hacinamiento y deficientes condiciones higiénicas⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. En cuanto a la patogenicidad del protozoario, algunos casos se han asociado con la coexistencia de una flora bacteriana patógena o potencialmente patógena, como factor que puede influir en la susceptibilidad del individuo y del curso de la infección. Este parásito muestra baja virulencia y la enfermedad parece ser un problema mayor en países en desarrollo, pudiendo ser un patógeno oportunista en individuos inmunosuprimidos que viven en ambientes urbanos, donde los cerdos no son la fuente de infección^(5,20).

La balantidiasis puede tener tres presentaciones clínicas: Infección asintomática, como ocurre en el cerdo, donde el hospedador se comporta como un reservorio del protozoario; infección crónica donde se alternan periodos de diarrea con constipación, síntomas abdominales no específicos y dolor abdominal secundario a la invasión del intestino grueso por trofozoitos y la balantidiasis fulminante, que se presenta como una disentería similar a la ocasionada por *Entamoeba histolytica*, donde se producen lesiones en el intestino, que son evidenciadas a través de la presencia de sangre y moco en las heces^(1,3,5,21). Existen escasos reportes de infección balantidiana extraintestinal, los cuales ocurren como un proceso secundario a una balantidiasis colónica, pudiendo mencionarse casos de peritonitis, uretritis, cistitis y vaginitis inflamatoria en mujeres, abscesos hepáticos, lesiones pulmonares⁽²²⁻²⁸⁾ y un caso fatal reportado en Venezuela, donde ocurrió perforación de apéndice y peritonitis, con presencia de parásitos alrededor de los vasos sanguíneos del pulmón⁽²⁹⁾. Los estudios relacionados con la prevalencia de *B. coli* tanto en humanos como en cerdos son escasos, tanto a escala mundial como en Venezuela, por lo tanto en este trabajo se planteó, investigar la presencia de *Balantidium* spp en cerdos de granja y criados domésticamente y correlacionar su hallazgo con la posible infección en las personas que los crían.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Materiales y métodos

Población: Se realizó la investigación parasitológica para la búsqueda de *Balantidium* spp, en cerdos, de ambos sexos y con edades entre 1-6 meses y adultos. Se examinó un total de 72 cerdos, 60 provenientes de una Granja porcina ubicada en Mariches, Edo Miranda y 12 criados domésticamente, provenientes de seis comunidades rurales ubicadas en Maniapure, Municipio Cedeño del Estado Bolívar (Mundo Nuevo, Chaviripa, El Ciruelo que son poblaciones criollas; El Guamal, Macanilla y Arepital, poblaciones Panare). También se realizó estudio de parasitosis intestinales a 51 individuos, niños y adultos, del sexo femenino y masculino, criadores de animales en la granja y criadores domésticos, así como a los habitantes aledaños, quienes tenían un contacto indirecto con los cerdos. De éstos, 16 personas provenían de la Granja Porcina y 35 eran habitantes de Maniapure. La recolección de las muestras se realizó en el lapso de un año.

Aspectos bioéticos y sensibilización de la comunidad: Este trabajo fue realizado cumpliendo en todas las etapas de la investigación con los procedimientos bioéticos de rigor, contemplados en las normativas y legislación nacional e internacional que rigen la materia ⁽³⁰⁾. En una primera etapa se realizó la sensibilización de las personas mediante visitas casa por casa, en las cuales se les entregó el documento de Consentimiento Informado (CI), en el cual se explicaba por escrito de manera clara y con un lenguaje adecuado, los objetivos del estudio y los riesgos y beneficios implicados. Esta información les fue explicada también verbalmente. Una vez que accedieron a participar en el estudio y dieron su consentimiento por escrito, se les dio las instrucciones para la toma adecuada de la muestra de heces de las personas y se les explicó cómo se tomarían las muestras de los animales, las cuales serían recolectadas por los investigadores.

Muestras: A las personas se les solicitó muestras de heces de tres días diferentes, para la realización del examen parasitológico. Las muestras de heces de los animales de la granja se tomaron con el apoyo de los trabajadores, previo lavado del piso de los criaderos. Cada vez que un cerdo defecaba, la muestra era recolectada y el cerdo era marcado con azul de metileno para evitar el muestreo doble. Las muestras de los cerdos domésticos, fueron tomadas de las heces recién emitidas en los patios de las casas en las cuales los animales se encontraban libres.

Estudio parasitológico: El examen parasitológico se realizó según el Protocolo de Investigación de Parasitosis Intestinales del Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina de la UCV ⁽³¹⁾. Las muestras de heces fueron examinadas mediante examen microscópico directo con solución salina al 0,85%, lugol, Quensel y Sudán III. Se realizaron métodos de concentración para la detección de quistes de protozoarios (Faust alta densidad) para huevos y larvas de helmintos (Kato y Rugai y cols) y cultivo para protozoarios (Boeck-Drbohlav modificado). Para la investigación de coccidios, se preservaron las muestras en dicromato de potasio al 2,5% (inducción de la esporulación) y se realizó frotis que fueron coloreados con la técnica de Ziehl Neelsen (modificado) y posterior medición con ocular micrométrico, en microscopio marca Olympus (modelo CRX).

Análisis estadístico: En este estudio descriptivo, los datos fueron expresados a manera de porcentaje. Se analizó estadísticamente con la prueba exacta de Fisher, χ^2 y razón de prevalencias (RP), siendo considerado como estadísticamente significativo todo valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Las frecuencias de protozoarios y helmintos encontrados en las muestras de heces de los 60 cerdos examinados, criados en la granja porcina ubicada en Mariches, Edo Miranda, así como en los 12 cerdos criados domésticamente en las comunidades Criollas y Panares de Maniapure, se reflejan en la tabla 1. La prevalencia de infección por *Balantidium* spp., en ambas poblaciones de cerdos fue similar ($p=0,163$), tanto en los cerdos criados domésticamente (67%, 8/12) como en los cerdos criados en la granja (65%, 39/60). Del 65% (39/60) de los cerdos de la granja que resultaron positivos para *Balantidium* spp, se detectaron quistes y/o trofozoítos por el examen microscópico directo más el cultivo en 69,2% (27/39) y con cultivo solo, en 30,8% (12/39) (tabla 2). La utilización del cultivo permitió el hallazgo de *Balantidium* spp, en las muestras de heces de los cerdos, en una mayor proporción ($\chi^2= 4,84$; $p= 0,028$).

La morfología y tamaño de los quistes (40-60 μm) y trofozoítos (80-150 μm) (figuras 1 y 2), así como el movimiento característico del ciliado (video 1), observado en el examen microscópico directo (preparaciones en fresco y coloreadas), a partir de las heces de los cerdos, permitió la identificación del protozoario.

http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=4767&rv=107

07/05/2013

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25



Figura 1.- Quistes de *Balantidium* spp. Examen microscópico directo a partir de heces de cerdo. A.- Examen en fresco con s.s 0,85%. 400x. B.- Coloración con lugol. 400x.

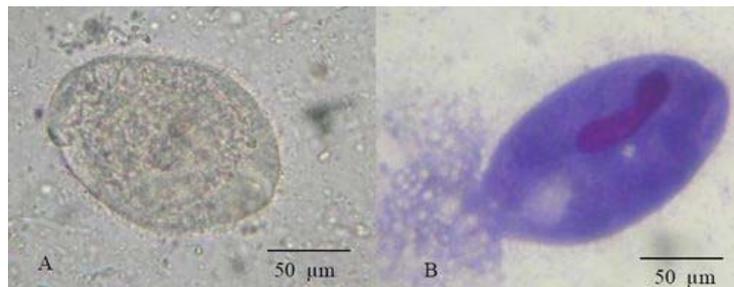


Figura 2.- Trofozoítos de *Balantidium* spp. Examen microscópico directo a partir de heces de cerdo. A.- Examen en fresco con s.s 0,85%. 400x. B.- Coloración de Giemsa. 400x.

En relación a otros protozoarios y helmintos hallados en los cerdos, se observó una mayor prevalencia de *Entamoeba* spp y *Trichomonas* sp en los cerdos de la granja, respecto a los cerdos del estado Bolívar ($p < 0,001$), otros como *Blastocystis* spp y coccidios, se presentaron en proporción similar. Aunque *Ascaris summ* y *Trichuris suis* solo se observaron en los cerdos de las granjas, la diferencia en estas frecuencias no fue estadísticamente significativa respecto a los cerdos criados domésticamente ($p = 0.173$ y $p = 0.320$ respectivamente) (tabla 1).

Protozoarios/Helmintos	Cerdos evaluados				p
	60 Criados en granja		12 Cría doméstica		
	n	%	n	%	
<i>Blastocystis</i> spp	58	97	11	92	0,456
Coccidios	41	68	7	58	0,203
<i>Balantidium</i> spp	31	65	8	67	0,163
Flagelados	31	52	6	50	0,136
<i>Trichomonas</i> sp	30	50	0	0	<0,001
<i>Entamoeba</i> spp	30	50	0	0	<0,001

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

<i>Ascaris suum</i>	9	15	0	0	0,173
<i>Trichuris suis</i>	6	10	0	0	0,320
Ancylostomideos	4	7	2	17	0,206
<i>Hymenolepis diminuta</i>	1	2	0	0	0,833

Tabla 1.- Frecuencia (absoluta y relativa) de protozoarios y helmintos en el estudio parasitológico de 72 cerdos, 60 provenientes de una granja porcina en Mariches (Estado Miranda) y 12 criados domésticamente en comunidades Criollas y Panares (Estado Bolívar).

METODO	n	%
Examen microscópico Directo+ Cultivo B-D	27	69,2
Cultivo B-D	12	30,8
Cualquiera de los métodos	39	100

Tabla 2.- Frecuencia de *Balantidium* spp. mediante diferentes métodos parasitológicos en 39 cerdos provenientes de una granja porcina ubicada en Mariches, Edo Miranda.

Entre las 51 personas evaluadas, 35 provenientes de diferentes comunidades criollas y Panares del Estado Bolívar y 16 provenientes de la granja porcina y sus alrededores, se encontró que 92% (47/51), estaban infectadas con algún protozoario y/o helminto y en 7,8% (4/51) no se detectó ninguna infección. Entre los que tenían alguna infección, 46,8% (22/47) tenían parásitos y el resto 53,2% (25/47) sólo estaban infectados con comensales. En ninguno de los grupos de personas examinadas se detectó la infección por *Balantidium* spp. De las 16 personas evaluadas en la granja, 31,3% (5/16) presentaron alguna parasitosis, 25% (4/16) con *Giardia duodenalis* y 6,3% (1/16) con *Giardia duodenalis* y *Ascaris lumbricoides*. Entre las 35 personas evaluadas en las comunidades criollas y Panares del estado Bolívar, 48,6% (17/35) resultaron parasitadas, 88,2% (15/17) monoparasitadas y 11,8% (2/17) poliparasitadas. La frecuencia de *Blastocystis* spp y *E. nana*, fue mayor en las personas de la granja respecto a los habitantes de las comunidades criollas y Panares, siendo sólo estadísticamente significativa para *Blastocystis* spp ($p < 0,001$). (tabla 3).

Protozoarios/Helmintos	Personas examinadas				p
	Habitantes de Comunidades Criollas y Panares		Habitantes de la granja y alrededores		
	n (35)	%	n (16)	%	
<i>Blastocystis</i> spp	14	40	16	100	<0,001
<i>Giardia duodenalis</i>	7	20	5	31	0,185
<i>Endolimax nana</i>	6	17	6	38	0,082
<i>Entamoeba coli</i>	6	17	2	13	0,305

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115	Código de verificación: qlm4G8RK	
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

Ancylostomideos	6	17	0	0	0,090
<i>Strongyloides stercoralis</i>	4	11	0	0	0,209
<i>Chilomastix mesnili</i>	3	9	0	0	0,314
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	6	1	6	0,457
<i>Trichuris trichiura</i>	2	6	0	0	0,466
<i>Entamoeba histolytica</i> y/o <i>E. dispar</i>	1	3	0	0	0,686
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	1	3	0	0	0,686
<i>Iodamoeba butschlii</i>	0	0	1	6	0,313

Tabla 3.- Frecuencia (absoluta y relativa) de protozoarios y helmintos en el estudio parasitológico de 51 personas, 16 que tenían contacto con cerdos en una granja porcina y sus alrededores ubicada en Mariches, Edo. Miranda y 35 pertenecientes a diferentes comunidades Criollas y Panares del Edo. Bolívar.

La frecuencia de Ancylostomideos, en las personas de ambas comunidades, mostró una tendencia a ser mayor ($p=0,090$), respecto a otras parasitosis. Las personas de las comunidades criollas y Panares mostraron una mayor variedad de protozoarios y helmintos respecto a los individuos de la granja, no siendo la probabilidad de hallazgo de estos protozoarios y/o helmintos significativamente diferente ($RP= 1.477$, $p= 0,224$).

En relación a los hábitos y condiciones higiénico-sanitarias, se observó que los habitantes de todas las comunidades mantenían estrecho contacto con los cerdos y con otros animales como perros, pavos, gallinas, loros y gatos, que se encontraban en los alrededores de las viviendas, tenían hábitos higiénicos deficientes y niños y adultos andaban descalzos, manteniendo contacto directo con la tierra. En la mayoría de las viviendas de las comunidades del estado Bolívar, se utilizaba el agua del río como fuente de abastecimiento, sin realizarle ningún tipo de tratamiento previo al consumo. También se observó que preparaban los alimentos sin las medidas higiénicas adecuadas.

Discusión

La prevalencia de 65% y 67% de *Balantidium* spp., en los cerdos provenientes de la granja porcina ubicada en Mariches y en los cerdos criados domésticamente en las comunidades criollas y Panares de Maniapure respectivamente, coinciden con reportes en diferentes poblados de la provincia de Yunnan (China)⁽¹⁴⁾, en los cuales encontraron una tasa de infección en cerdos entre 62,4% y 94,76%. A su vez la prevalencia en este estudio fue mayor que la reportada en un estudio realizado en cerdos del Edo, Bolívar, donde reportan 33% de prevalencia de *B. coli*⁽¹³⁾. Por otra parte, se pudo observar que la prevalencia superior al 60%, encontrada en ambos grupos de cerdos, no pareciera tener relación con el tipo de alimentación y condiciones de crianza de estos animales.

En relación con los métodos empleados para el diagnóstico parasitológico, se observó que todas las muestras positivas para *Balantidium* spp, fueron detectadas mediante el cultivo en el medio de Boeck-Drbohlav (mod). Todas las muestras positivas en el examen microscópico directo también resultaron positivas en el cultivo, pero, no todas las muestras positivas en el cultivo, habían sido detectadas en el examen microscópico directo. Estos resultados nos permiten resaltar la importancia del cultivo como método de investigación de este protozoario, para aumentar la probabilidad del hallazgo parasitológico de *Balantidium* spp y obtener resultados de prevalencia más ajustados a la realidad.

En cuanto a la identificación, mediante el examen microscópico directo se puede visualizar el movimiento del ciliado, el tamaño y la morfología característica, tanto en el examen en fresco

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

con solución salina, como coloreado con lugol y Giemsa. Con estas características se pudo hacer la identificación del género *Balantidium*, pero dado que *B. coli* y *B. suis* son morfológicamente idénticos, no se pudo diferenciar entre ambas especies.

Todas las personas examinadas en el estudio, tanto las que tenían contacto directo con cerdos como las que no lo tenían, resultaron negativas a la investigación para *B. coli*, lo cual coincide con la baja prevalencia reportada en el mundo (0,02 -1%)^(9,12), pero discrepan de otros en comunidades rurales de Bolivia (1,0 -5,3%)⁽¹²⁾, una comunidad indígena de Delta Amacuro-Venezuela (5% en niños Warao menores de 12 años)⁽³²⁾, una comunidad rural del Edo. Bolívar-Venezuela, (12%)⁽¹³⁾ y de un caso aislado reportado en Venezuela, con antecedente de contacto estrecho con cerdos⁽²¹⁾.

La infección con *B. coli* en humanos está asociada a una dieta baja en proteínas y alta en carbohidratos, aclorhidria, ingesta de alcohol e infección con bacterias u otros parásitos, a factores ambientales como la humedad y la temperatura, ya que ambientes húmedos favorecen la supervivencia de los quistes durante varias semanas^(1-3,9,24) y su baja prevalencia se ha explicado en parte, por las diferencias antigénicas⁽⁵⁾, ya que el hombre es con frecuencia altamente resistente a la infección por *B. coli*, aún cuando viva en contacto cercano con cerdos y condiciones sanitarias deficientes^(1,9). Se ha propuesto que los humanos tienen una fuerte resistencia, natural o adquirida a *B. coli* y no muestran ningún signo después de la infección^(14,16), lo cual se apoya en la baja prevalencia encontrada en adultos que han tenido estrecho contacto con cerdos. Una vez que *B. coli* se ha establecido en el hombre, la infección puede tornarse epidémica, siempre que las condiciones sanitarias del medio sean deficientes y la higiene personal escasa⁽¹⁾.

En la literatura se hace referencia a la manipulación de cerdos como un factor predisponente a la infección con este protozoario^(1-3,5,13,21). No obstante, en algunos estudios realizados no se han encontrado *B. coli* en individuos que laboran en la crianza de cerdos y que además viven bajo condiciones sanitarias deficientes, lo cual coincide con el presente resultado. Sin embargo, sí se han reportado hallazgos en sitios donde no hay crianza de cerdos, tales como hospitales psiquiátricos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, en los cuales la higiene personal y ciertos hábitos, como la coprofagia, pueden ser consideradas como forma de transmisión. Esto apoyaría la tesis de que la especie que infecta al hombre no es igual a la del cerdo. El contacto estrecho de las personas cuidadoras de cerdos y de los niños con estos animales, observado en las comunidades estudiadas, debería ser un factor que favoreciera la transmisión de *Balantidium* a las personas. No obstante, en este estudio no se determinó ningún caso de balantidiasis en las personas examinadas. Siendo un protozoario que comúnmente infecta al cerdo y éste a su vez es un animal relacionado con el hombre, la ausencia del protozoario, en este estudio no permiten establecer una relación directa entre el contacto con estos animales y la transmisión al humano, lo cual abre la necesidad de realizar estudios para investigar cual es la especie que infecta al cerdo mediante técnicas como la biología molecular.

Mientras que *B. coli* puede ser transmitido experimentalmente del hombre al gato, al mono y al cerdo, los intentos por infectar voluntarios humanos con *Balantidium* del cerdo y del mono han fracasado⁽¹⁵⁾, lo cual podría ser explicado por la existencia de diferencias antigénicas y genéticas, entre las cepas de humanos y cepas de *B. coli* porcino. Se ha demostrado que los trofozoítos de cepas que se adaptan y reproducen con mayor rapidez en el cultivo, generan más síntomas, además las condiciones físicas del hospedero juegan un papel importante para que se manifieste la balantidiasis⁽⁵⁾.

Se observó una alta prevalencia de *Blastocystis* spp, tanto en cerdos como en humanos, lo cual puede sugerir que quizá se esté dando una infección de este parásito entre animales y el hombre, tal como lo reportan algunos estudios⁽³³⁾, por lo cual sería interesante evaluar en próximos estudios, los genotipos de *Blastocystis* presentes en las personas y en los cerdos y esclarecer si ambos hospedadores están compartiendo la misma fuente de infección, existiendo la posibilidad de transmisión directa del cerdo al humano y viceversa. La mayoría de las parasitosis intestinales humanas producidas por protozoarios y helmintos, así como algunas extraintestinales, se originan por los hábitos y costumbres higiénicas deficientes, así como la práctica de defecación en campo abierto, donde quedan expuestos junto con la materia fecal los quistes de protozoarios y huevos de helmintos, que pueden ser infectantes desde el momento de su expulsión o requerir de cierto tiempo para tornarse infectantes^(1-3,5). De igual manera, en las comunidades del Edo. Bolívar estudiadas, se observó a los niños descalzos, jugando en la tierra y manteniendo contacto directo con los cerdos y con otros animales como perros, pavos, gallinas, loros y gatos, que se encontraban alrededor de las viviendas o dentro de las mismas. En la mayoría de las viviendas el agua utilizada se tomaba del río y su consumo se hacía sin tratamiento previo, de igual manera que algunos alimentos no eran procesados con las medidas higiénicas adecuadas. Además de las condiciones anteriormente descritas, la temperatura cálida y la excesiva humedad en estas localidades del Edo. Bolívar son factores que favorecen la transmisión de las parasitosis intestinales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

En cuanto a los organismos identificados en las personas estudiadas, se puede notar que los protozoarios se presentaron en mayor número con respecto a los helmintos tanto en las personas de la granja y sus alrededores, así como en las personas de las diferentes comunidades del Edo. Bolívar, siendo los más frecuentes: *Blastocystis* spp, *G. duodenalis* y *E.nana*. De los helmintos, el primer lugar lo ocupa en el caso de la granja, *Ascaris lumbricoides* con un 6% y en las diferentes comunidades del Edo. Bolívar están los Ancylostomideos con un 17%, siguiendo con *Strongyloides stercoralis* con un 11% y finalmente *T. trichiura* y *A. lumbricoides* ambos con 6%, siendo esto consecuencia directa de las condiciones deficitarias del medioambiente y del saneamiento ambiental (eliminación inadecuada de excretas y falta de agua potable), factores dependientes del parásito y también debido a las características del hospedador: bajo nivel educacional y cultural y carencias nutricionales multifactoriales. Además se puede observar que resultaron parasitadas con Ancylostomideos y *S. stercoralis*, únicamente las personas provenientes de las diferentes comunidades rurales del Edo. Bolívar, atribuyéndose este hecho a que las personas pertenecientes a las comunidades Panares mantienen mayor contacto con la tierra, al encontrarse en su mayoría descalzos y realizar actividades agrícolas, lo que facilita la infección con este tipo de parásitos, a diferencia de las personas de la granja donde la mayoría de las veces los niños usaban zapatos.

Si bien, en este trabajo no se pudo establecer ninguna relación en cuanto a la transmisión de *Balantidium* spp. al humano, sí se podría inferir la importancia que podría tener la infección con *Blastocystis* spp. en los cerdos y su posible transmisión al hombre, dada la elevada frecuencia del mismo en ambos hospedadores, tal como ya ha sido previamente planteado ⁽³³⁾.

Estos resultados muestran la necesidad de realizar estudios similares en diversas regiones del país, para establecer con certeza la prevalencia de *Balantidium* spp., tanto en cerdos como en humanos, así como confirmar mediante biología molecular si la especie es *B. coli* o *B. suis*.

Agradecimiento. A las personas que participaron en este estudio quienes dieron su consentimiento para que se les practicara el examen parasitológico, así como a los propietarios y trabajadores de la Granja y los propietarios de los cerdos criados domésticamente en las comunidades rurales del estado Bolívar, quienes facilitaron el acceso y toma de muestra de los animales.

Este Trabajo fue financiado por los ingresos propios del Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV.

Referencias

1. - Beaver PC, Cupp EW, Jung PC. Parasitología Médica. 2^{da} ed. Ediciones Salvat; 1991. p. 231-235.
2. - Zaman V. *Balantidium coli*. In: Parasitic protozoa. 2nd ed., vol 3. Academic Press Inc; 1993. p. 43-63.
- 3.- Rey L. Parasitología. Parásitos o doenças parasitarias do Homen nas Américas e na África. 2^{da} ed. Editorial Guanabara Koogan; 2001. p. 397-399.
- 4.- Awakian A. Studies on the intestinal protozoa of rats. II.- Rats as carries of *Balantidium*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1937; 31:93-98.
- 5.- Schuster FL, Ramirez L. Current status of *Balantidium coli*. Clin Microb Rev 2008; 21:626-638.
- 6.- Kiyoshi N. The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. J Vet Med Sci 1999; 61: 63-65.
- 7.- Ponce-Gordo F, Fonseca- Salamanca F, Martínez- Díaz RA. Genetic heterogeneity in internal transcribed spacer genes of *Balantidium coli* (Litostomatea, Ciliophora). Protist 2011; 162:774-94.
- 8.- Nilles-Bije ML, Rivera WL. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantidium coli* isolated in the Philippines. Parasitol Res 2010; 106:387-94.
- 9.- Walzer P, Judson F, Murphy G, English D, Schultz M. Balantidiasis outbreak in Turk. Am J Trop Med 1973; 22:33-41.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

10.- Couvée L, Rijpstra A. The prevalence of *Balantidium coli* in the Central Highlands of Western New – Guinea. Trop Geogr Med 1961; 13:284 -286.

11.- Radford AJ. Balantidiasis in Papua New Guinea. Med J Aust 1973 ;1:238-41.

12.- Esteban JG, Aguirre C, Angles R, Ash LR, Mas-Coma S. Balantidiasis in Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:922- 927.

13.- Devera R, Requena I, Velásquez V, Castillo H, Guevara R, De Sousa M, Marín C, Silva M. Balantidiasis en una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. Bol Chil Parasitol 1999;54:7 -12.

14.- Yang Y, Zeng L, Li M, Zhou J. Diarrhoea in piglets and monkeys experimentally infected with *Balantidium coli* isolated from human faeces. J Trop Med Hyg 1995; 98: 69-72.

15.- Young MD. Attempts to transmit human *Balantidium coli*. Am J Trop Med 1950; 30:71-72.

16.- Koneman E. Diagnóstico Microbiológico. 3^{ra} ed. Editorial Médica Panamericana; 1998. p. 721-723.

17.- Brooke MM, Wilcox DE, Kaiser RL, Melvin DM. Investigation of factors associated with the decline of intestinal protozoa in a Kansas mental institution. Am J Hyg 1962;76:52-56.

18.- Sholten T, Yang J, Palmer J. Parasitism in an Ontario mental institution: Preliminary report. CMAJ 1977; 116:1114-1115.

19.- Giacometti A, Cironi O, Balducci M, Drenaggi D, Quarta M, De Federicis M, Ruggeri P, Colapinto D, Ripani G, Scalise G. Epidemiologic features of intestinal parasitic infections in Italian mental institutions. Eur J Epidemiol 1997; 13:825-30.

20.- Yazar S, Altuntas F, Sahin I, Atambay M. Dysentery caused by *Balantidium coli* in a patient with non-Hodgkin's lymphoma from Turkey. World J Gastroenterol 2004; 10:458-459.

21.- Cheng-Ng R, Mindiola R, Villarroel F, Dorfman S, Díaz-Suárez O, Atencio R. Balantidiasis en una niña indígena de la Sierra de Perijá-Venezuela. Reporte de un caso. Kasmera 2006; 34:127-132.

22.- Vásquez W, Vidal J. Colitis Balantidiásica: A propósito de un caso fatal en el departamento de Huancavelica. An Fac Med 1999; 60:119-123.

23.- Sharma S, Harding G. Necrotizing lung infection caused by the protozoan *Balantidium coli*. Can J Infect Dis 2003; 14:163- 166.

24.- González de Canales S, Martínez A, Hernández T, Arranz S. Balantidiasis cólica. Gastroenterol Hepatol 2000; 23:129 -131.

25.- Álvarez VR, García TR. Estudio de un caso mortal de balantidiosis humana. Rev Invest Salud Pública 1967; 27:217-224.

26.- Isaza-Mejía G. Balantidiasis vaginal. Antioquia Med 1955; 5:488-91.

27.- Francesco R, Giannotti T. *Balantidium coli* in cervico-vaginal cytology. A case report. Pathologica 1983; 75:439-442.

28.- Areal VM, Koppisch E. Balantidiasis. A review and report of cases. Am J Pathol 1956; 32:1089-1116.

29.- Dorfman S, Rangel O, Bravo LG. Balantidiasis: report of a fatal case with appendicular and pulmonary involvement. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984;78:833-834.

30.- Código de Bioética y Bioseguridad. FONACIT-MCT. 2^{da} 2003.

31.- Pérez de Suárez E, Guzmán de RC. Protozoarios Intestinales: Agentes de enfermedad en el hombre. Criterios para su diagnóstico. 1^{ra} ed. Coedición: Fuvesin/Insalud; 1999; p. 7-66.

32.- Fernández V H. Prevalencia de parasitosis intestinales en niños Warao menores de 12 años en la comunidad de Wuimamorena II, del Estado Delta Amacuro en el mes de Mayo de 2001. Trabajo de Investigación de Pasantía Rural. 2001.

33.- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson A. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. Vet Parasitol 2010; 169:8-17.

http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=4767&rv=107

07/05/2013

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: q1m4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

NOTA: Toda la información que se brinda en este artículo es de carácter investigativo y con fines académicos y de actualización para estudiantes y profesionales de la salud. En ningún caso es de carácter general ni sustituye el asesoramiento de un médico. Ante cualquier duda que pueda tener sobre su estado de salud, consulte con su médico o especialista.

http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=4767&rv=107

07/05/2013

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. <i>Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/</i>		
Identificador del documento: 914115		Código de verificación: qlm4G8RK
Firmado por:	CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
	JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
	ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
	BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Reporte de cinco casos de Cyclosporiasis en un centro penitenciario en Venezuela

Cyclosporiasis five cases report in Venezuelan penitentiary center

ANAIBETH J NESSI P*, CARMEN T GUZMÁN DE R*, CAROLINA M WAGNER A*, ANGELYSEB D DORTA P*,
MÓNICA V GALINDO P*, MARÍA A VETHENCOURT*, MARÍA V PÉREZ DE G*

RESUMEN

Cyclospora cayetanensis, es un protozooario intestinal humano, productor de diarrea en individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos. La transmisión ocurre por ingestión de oocistas que han esporulado en el ambiente. La transmisión del parásito ocurre a través de un vehículo ambiental. En los países en vías de desarrollo, la ciclosporiasis se ha relacionado con el agua y los alimentos contaminados, contacto con la tierra o animales, y variables asociadas con bajas condiciones socioeconómicas. En junio de 2004 se realizó un estudio parasitológico en un centro penitenciario en Venezuela, donde se presentaron varios casos con diarrea. A 7 personas del sexo masculino, con edades entre 19-39 años y con diarrea de 2 a 10 días de duración, se les realizó examen de heces con S.S. 0,85%, lugol, Quesel, Sudán III, Ziehl Neelsen, Micrometría y Esporulación en K₂Cr₂O₄ 2,5%. Se encontró oocistas de *C. cayetanensis* en 5 (71, 42%) y huevos de Ancylostomídeos en 1 (14,3%). El número de casos, en los cuales se observó *C. cayetanensis*, en individuos con diarrea, en este centro penitenciario en Venezuela, resulta muy llamativo en virtud de ser este un microorganismo de baja prevalencia a escala mundial y nacional. No obstante, las condiciones de hacinamiento y probablemente medidas higiénicas inadecuadas, tanto en las áreas físicas como en la conservación y manipulación del agua y alimentos, favorecen la transmisión de parásitos que ocasionan diarrea. Lo cual demuestra, la necesidad de establecer medidas de control y educación sanitaria a los manipuladores de alimentos, para evitar la transmisión y aparición de diarrea por diversos agentes infecciosos entre estas poblaciones.

Palabras clave: *Cyclospora cayetanensis*, diarrea, centro penitenciario.

ABSTRACT

Cyclospora cayetanensis is a human intestinal protozoan, causing diarrhea in immunocompetent and immunocompromised individuals. Transmission occurs by ingestion of oocysts that have sporulated in the environment. In developing countries, ciclosporiasis has been associated with contaminated food and water, contact with soil or animals and low socioeconomic conditions. In June 2004, a parasitological survey in a venezuelan prison in, where several diarrhea cases appeared. All seven (7) people were male, age ranging 19-39 year-old with diarrhea during between 2 and 10 days; they were evaluated by stool examination with ss 0,85%, iodine, quensel, sudan III, Ziehl Neelsen stain/micrometry and sporulation in K₂Cr₂O₄ 2,5%. *C. cayetanensis* oocysts were found in 5 (71,42%) and hookworm eggs in one (14,3%). The number of diarrhea cases at this prison in Venezuela in which *C. cayetanensis* was observed, is very striking, knowing the premise for this microorganism to be global and regional low prevalent protozoan. However, overcrowding and poor hygienic measures, probably both, in the physical areas and in the storage and food/water handling, contribute to diarrhea-causing parasites transmission. This shows the need to implement control measures and health education for food handlers to prevent transmission and diarrhea outbreaks caused by infectious agents among this population.

Keywords: *Cyclospora cayetanensis*, prison, diarrhea.

* Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

INTRODUCCIÓN

Cyclospora cayetanensis, es un protozooario parásito intestinal del Phylum *Apicomplexa*, del cual el hombre es el único hospedero conocido. El género *Cyclospora* fue descrito por primera vez en 1862 (1), el primer caso publicado en personas con diarrea se debe a Ashford (1972) (2), en Papua, Nueva Guinea, aunque él no identificó al parásito como *Cyclospora*. Otros casos similares fueron posteriormente reportados, pero fueron los trabajos de Ortega y col. (1), los que identificaron al parásito como un coccidio del género *Cyclospora* por inducción de la esporulación y microscopía electrónica y la especie *cayetanensis* fue adjudicada en honor a la Institución donde fue encontrado (1,3). Este protozooario intestinal infecta a pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos produciéndoles diarrea prolongada. Su ciclo de vida es intracelular obligado dentro de las células del epitelio gastrointestinal, donde ocurre la reproducción asexual y sexual que dará origen a los ooquistes. La infección se inicia con la ingestión de agua o alimentos contaminados con los ooquistes que han esporulado en el ambiente (4-6). En las heces, el ooquiste no esporulado de *Cyclospora cayetanensis*, se observa de forma esférica o ligeramente oval, presenta una pared gruesa y mide entre 7,5-10 µm de diámetro, contiene en su interior un cigoto, formado por un cúmulo de glóbulos refringentes, dispuestos en forma de roseta (4,7), una vez que madura se forman dos esporoquistes en los cuales se formarán dos esporozoitos. La esporulación de los ooquistes ocurre fuera del intestino y puede ser inducida en solución de dicromato de potasio al 2,5% o en agua (1,7).

Los ooquistes presentan autofluorescencia cuando son expuestos a luz fluorescente, usando filtros de excitación entre 330-380 nm, emitiendo autofluorescencia azul, mientras que con filtros de 450-490 nm, el color observado es verde manzana (4,5).

En las coloraciones como Ziehl-Neelsen (modificado) o Kinyoun, los ooquistes se colorean de manera variable, observándose desde un color fucsia intenso hasta un rosado claro, o no toman coloración alguna, por lo cual se ve solo la silueta redondeada, con un aspecto corrugado o con hoyuelos en su interior, semejante a una pelota de golf (7).

Cyclospora cayetanensis produce diarrea prolongada asociada con fatiga general y anorexia en personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas. La enfer-

medad puede ser severa en niños, ancianos y personas inmunosuprimidas. Se han reportado casos asintomáticos en adultos inmunocompetentes. El período de incubación en promedio varía cerca de 7 días. La diarrea se puede presentar de manera abrupta o aparecer gradualmente. La evacuación es acuosa y explosiva, y puede acompañarse de náuseas, vómitos, dolores abdominales. Los síntomas en pacientes inmunocompetentes son autolimitados, cediendo sin tratamiento después de varias semanas o meses. La diarrea puede durar de 10-24 días. La fatiga y el malestar general son los dos síntomas más persistentes (5-11).

En relación a la prevalencia de esta parasitosis, se han reportado casos aislados así como brotes epidémicos en diversos lugares del mundo. En Chicago ocurrió un brote en 1990, donde se detectaron por lo menos 20 empleados de un hospital infectados por *C. cayetanensis* y en 1994, otro brote en Nepal que afectó a un grupo de soldados británicos. En ambos casos se consideró como fuente de infección el agua contaminada con ooquistes (8). A partir de 1996 al menos 12 brotes han afectado a 3.600 personas de los Estados Unidos, Canadá y más recientemente Colombia, todos relacionados con el consumo de agua y alimentos contaminados, tales como fresas y vegetales verdes, especialmente cilantro y lechuga (12-18). Ya anteriormente hemos reportado casos aislados de cyclosporiasis en el Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, UCV los cuales se caracterizaron por una marcada estacionalidad (7).

PACIENTES Y MÉTODOS

La investigación del posible agente etiológico, de los casos de diarrea ocurridos en Junio 2004, en un centro penitenciario de Venezuela, fue solicitada por el Ministerio del Interior, Departamento de Salud Integral, ante el Programa de Extensión Penitenciario de la UCV, el cual se desarrolla en la Dirección de Extensión Universitaria de la UCV. A través de la coordinación de este proyecto se solicitó al Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina, la realización de la investigación etiológica a las personas con diarrea en dicho centro.

Población

Se estudió 7 individuos que presentaban diarrea, con edades entre 19 y 39 años, todos del sexo masculi-

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

no, provenientes de la comunidad del centro penitenciario los cuales fueron los únicos que entregaron la muestra para el momento de la convocatoria. Aun cuando se presentó un número importante de personas afectadas por diarrea durante un período entre 2 a 10 días.

La información personal, datos epidemiológicos y los síntomas presentados por las personas evaluadas, fueron recopiladas en un instrumento diseñado para tal fin. En todas las etapas de la investigación se cumplió con los procedimientos bioéticos de rigor y la correspondiente firma del Consentimiento Informado (19).

Metodología

Se realizó el examen parasitológico en una sola muestra de las heces. El análisis de la misma se realizó aplicando el protocolo de diagnóstico utilizado en el Laboratorio de Amibiasis, para la investigación de protozoarios (20), que consistió en: Estudio físico-químico de las heces, examen microscópico directo con solución salina 0,85%, Iugol, Quensel, Sudán III, fijación en líquido de Schaudinn para colorear con Hematoxilina férrica, coloración de Ziehl Neelsen (modificado), método de concentración de Faust- alta densidad. Como método confirmatorio, la inducción a la esporulación en Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₄) 2,5% a temperatura ambiente. Para evidenciar la esporulación de los ooquistes se realizó la observación microscópica de alícuotas de la suspensión en dicromato diariamente durante tres semanas. Se realizó cultivo para protozoarios intestinales en medio de Boeck y Drbohlav (modificado) (BDM), el cual se examinó a las 24, 48 y 72 horas, mediante examen microscópi-

co en fresco del sedimento. Se realizó micrometría de los ooquistes observados usando microscopio Olympus calibrado, con ocular micrométrico para medición e identificación parasitológica con aumentos de 400x y con cámara adaptada para el registro fotográfico. sedimento (4-5,7,20).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los signos gastrointestinales y los hallazgos microscópicos que presentaron 7 personas a quienes se les realizó el examen parasitológico de las heces se muestran en la Tabla 1. En 5 de ellos se observó ooquistes de *C. cayetanensis* (Figura 1), en una persona se observó huevos de Ancylostomideos y en la otra no se observó ningún parásito. En todos los casos la identificación de *C. cayetanensis* se basó en el tamaño de los ooquistes (8,5 µm), la inducción de la esporulación en dicromato de potasio 2,5% con la aparición del ooquiste con dos esporoquistes en su interior, después de 9 días (Figura 1 B).

Cabe destacar que la limitación de realizar solamente un examen de heces, condiciona la posibilidad de no realizar el hallazgo del parásito. Situación que pudo haber ocurrido en las dos personas donde este no se observó. Esto se ha reportado para otras parasitosis intestinales, donde la excreción de las formas evolutivas de los parásitos es intermitente y se requiere del examen de más de una muestra de heces para su hallazgo (19).

Siendo ésta una parasitosis de baja prevalencia a escala mundial y nacional, es llamativo que se hayan diagnosticado 5 casos entre las 7 personas con diarrea, quienes provenían de un mismo lugar, en este caso, un centro

Tabla 1

Hallazgos parasitologicos en 7 individuos con Cyclosporiasis en un Centro Penitenciario de Venezuela. Junio 2004

Persona	Género	Edad años	Signos	Hallazgo Parasitológico
Individuo 1	Masculino	39	Diarrea	Ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i>
Individuo 2	Masculino	19	Diarrea	Ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i>
Individuo 3	Masculino	20	Diarrea	Ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i>
Individuo 4	Masculino	18	Diarrea	Ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i>
Individuo 5	Masculino	19	Diarrea	No se observó quistes ni trofozoítos de protozoarios, huevos ni larvas de helmintos
Individuo 6	Masculino	20	Diarrea	Ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i>
Individuo 7	Masculino	19	Diarrea	Huevos de Ancylostomideos.

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

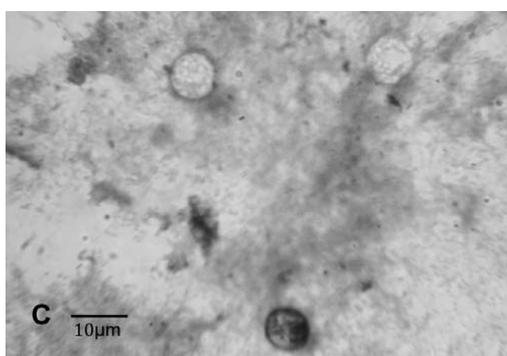
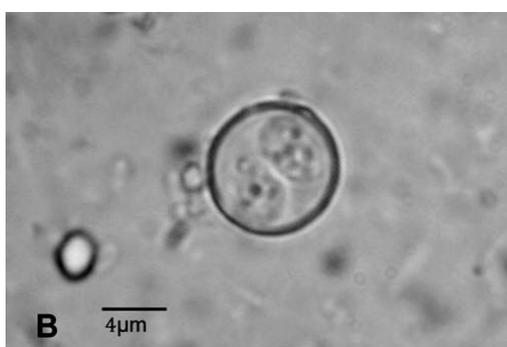
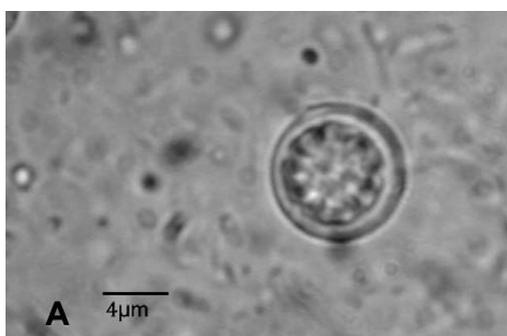


Figura 1. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis*. A.- Ooquiste inmaduro de pared gruesa, con estructuras esféricas refringentes. Examen en fresco con S.S. 0,85%. 100X. B.- Ooquiste maduro con dos esporoquistes. Examen al fresco a partir de solución de Dicromato de potasio 2,5%. 100X (Amplificación de 2,5) C.- Se observa tinción variable de Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* con la coloración de Ziehl Neelsen Modificado. 100x

penitenciario. Otro hecho importante es que dichos casos se presentan en el mes de junio, mes que entra dentro del período en el cual se han hecho los reportes de esta protozoosis en Venezuela y el mundo (5-7).

Por otra parte, es importante mencionar que la infraestructura en la mayoría de los centros penitenciarios en general, adolece de una adecuada ventilación e iluminación, además no cuenta con una adecuada disposición de aguas servidas y sistemas de desagües, no poseen suministro de agua en forma regular y generalmente la misma se almacena en pipotes inadecuados, y el personal que la manipula, no tiene conocimiento para el adecuado procedimiento de potabilización. Debido a lo antes señalado que expone, las precarias condiciones de salubridad de estos centros de reclusión en nuestro país, podría explicar la aparición de esta parasitosis en este grupo de personas que comparten espacios vitales reducidos e higiénicamente deficientes (23).

Del análisis de estos casos, se podría inferir que la infección con *Cyclospora cayetanensis* probablemente se adquirió mediante el consumo de aguas o alimentos contaminados con ooquistes maduros, siendo la transmisión directa de persona a persona poco probable, debido a que los ooquistes eliminados en las heces recién emitidas no son infectantes, por no estar esporulados (1,4, 7-12, 24).

El inadecuado lavado de los vegetales y frutas que se consumen crudos, es un factor que expone a los comensales a adquirir infecciones intestinales por agentes patógenos, lo cual favorece la transmisión de parasitosis en general y en especial estas coccidiosis que ocasionan diarrea al humano (6).

Por otro lado también es importante destacar que se debe promover la adecuada disposición de las excretas humanas en los sitios destinados para tal fin, así como el mantenimiento y limpieza de los mismos, porque existen vectores mecánicos (insectos, roedores, u otros) que pueden llevar agentes infecciosos y contaminar los alimentos. En este caso particular, como la maduración o esporulación de los ooquistes de *C. cayetanensis* ocurre en el ambiente, existe la posibilidad de que los residuos fecales que contienen el parásito quedan expuestos en el ambiente, éstos maduren y puedan ser transmitidos (1,13-14).

En este tipo de instituciones es imprescindible que se establezcan medidas de control basadas principalmente en la educación sanitaria, tanto a los manipuladores de

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25

alimentos como a todo el personal que allí se encuentra para evitar infecciones con patógenos intestinales.

AGRADECIMIENTOS

A los coordinadores del Proyecto de Extensión Penitenciaria de la UCV, en especial a la Profesora Angela Posada, por la invitación a participar en el esclarecimiento de estos casos y por el apoyo logístico. Al Ministerio del Interior, Departamento de Salud Integral y a los reclusos y soldados del Centro Penitenciario, sin cuya colaboración no se habría podido hacer esta evaluación parasitológica.

Este trabajo fue financiado parcialmente por ingresos propios del Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología y por la Escuela de Bioanálisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ortega Y, Sterling Ch, Gilmán RH. *Cyclospora* species: A New Protozoan Pathogen of Humans. The New England Journal of Medicine. 1993; 328 (18):1308-1312.
2. Asford RW. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea, Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1979; 73(5):497-500.
3. Ortega YR, Gilman RH, Sterling ChR. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. Journal of Parasitology. 1994; 80:625-629.
4. Ortega YR, Sterling Ch R, Gilman RH. *Cyclospora cayetanensis*. Adv Parasitol. 1998; 40:309-417.
5. Ortega RY, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a Food-Borne and Waterborne Parasite. Clinical Microbiology Reviews, 2010; 23, (1) p. 218-234
6. Chacín-Bonilla L. Review Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. Acta Tropica 115 (2010) 181-193
7. Nessi PA, Guzmán de Rondón C, Pérez de Suárez E. Identificación de *Cyclospora cayetanensis* en ocho pacientes con diarrea: criterios para su diagnóstico. GEN. 2002; 56(1):17-24.
8. Wurtz R. *Cyclospora*: A newly identified intestinal pathogen of humans. Clin Inf Dis. 1994; 18:620.
9. Connor BA, Shlim DR, Scholes JV, Rayburn JL, Reidy J, Ramachandran R. Pathologic changes in the small bowel in nine patients with diarrhea associated with a coccidia like-body. Annals of Internal Medicine. 119:377-382.
10. Herwaldt B. 2000. *Cyclospora cayetanensis*: A review, focusing on the outbreaks of Cyclosporiasis in the 1990s. Clinical Infection Disease. 1993; 31:1040-1057.
11. Soave R. *Cyclospora*: An overview. Clinical Infectious Diseases. 1996 23:429-437.
12. Huang P, Weber JT, Sosin DM, Griffin PM, Long EG, Murphy J, Kolka F, Peters C, Kallieck C. The First reported outbreak of diarrhoeal illness associated with *Cyclospora* in the United States. Ann Int Med. 1995; 123: 409-414.
13. Rabold GJ, Hoga ChW, Shlim DR; Kefford C, Rajah R, Echeverría P. *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. Lancet. 1994; 344:972.
14. Connor BA, Shlim DR. Foodborne Transmisión de *Cyclospora*. Lancet.1995; 346(1):1634.
15. Herwaldt BL, Ackers ML. *Cyclospora* break in 1996 of cyclosporiasis associated to raspberries. N Engl J Med. 1997; 336: 15.
16. From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of pseudo – infection with *Cyclospora* and *Cryptosporidium* Florida and New York City 1995. JAMA. 1997; 277(18):1428-1429.
17. Botero-Garces J, Montoya-Palacios M, Barquil J, Castaño-González A. Brote epidémico por *Cyclospora cayetanensis* en Medellín, Colombia. Rev. salud pública. 2006; 8(3):258-268
18. Código de Bioética y Bioseguridad. FONACIT-MCT. 2 ed; 2003.
19. Pérez de Suárez E, Guzmán de Rondón C. Protozoarios intestinales: Manual de laboratorio. Criterios para su diagnóstico. Coedición Fuvesin/Insalud; 1999.
20. Weltz VJ, Weltz RC, Canales RM, Moya RR. Infección por *Cyclospora cayetanensis*. Revisión a propósito de tres casos de diarrea del viajero. Rev.chil.infectol. 2009; 26(6):549-554.
21. Mansfield L, Gajadhar A. *Cyclospora cayetanensis*, a food and waterborne coccidian parasite. Vet Parasitol. 2004; 126:73-90.
22. Ortega YR, Nagle R, Gilman RH, Watanabe J, Miyagui J, Quispe H, Kanagasuku P, Roxas C, Sterling Ch R. Pathologic and Clinical findings in patients with Cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle stages. The Journal of Infectious Diseases. 1997; 176: 1584-1589.
23. Posada LA, Salazar RE. Las Cárceles: Una Visión. Ediciones del Rectorado de la Universidad Central de Venezuela. Capítulo IV. 2004:75-81.
24. Chacín-Bonilla L, Barrios F, Cheng-Ng R. *Cyclospora cayetanensis*: Fuentes y Mecanismos de transmisión Inter-ciencia. 2010; 35, (9): 666-672.

Recibido: 14 de diciembre de 2010 / Aprobado: 25 de marzo de 2011

Identificador del documento: 914115	Código de verificación: q1m4G8RK	Fecha: 25/05/2017 11:46:38
Firmado por: CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		01/06/2017 13:54:25



Artículo original

Comportamiento biológico de *Blastocystis hominis* en pacientes tratados con Secnidazol (Unidazol®)

Carmen Guzmán de Rondón^{a*}, María Alejandra Vethencourt^a, Mónica Galindo Pérez^a, Nathalie Chacón^b, Carolina Wagner^a, Anaibeth Nessi Paduani^a

^aLaboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología, Escuela de Biotecnología

^bSección de Geohelminthiasis, Instituto de Medicina Tropical

Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela

Caracas - Venezuela

Recibido 10 de marzo de 2008, aceptado 05 de mayo de 2008

Resumen: *Blastocystis hominis*, clasificado como *Stramenopile*, es el parásito intestinal más frecuente en el hombre. En las heces y cultivos se observan formas con cuerpo central (FCC), granulosas (FGra), globulosas, ameboides, en división binaria y quistes. Su elevada prevalencia, asociación con síntomas en el humano y carencia de tratamiento efectivo, justificó la evaluación del Secnidazol (Unidazol® ZUOZ-PHARMA) en 14 individuos (7 varones y 7 hembras), infectados con *B. hominis*, con edades entre 5-79 años, quienes fueron evaluados clínica y parasitológicamente antes y después del tratamiento, con una dosis del medicamento: 2g (adultos) y 30 mg/Kg/peso (niños). En el examen seriado de heces (3 muestras), se evaluó la morfología, número por campo microscópico (400X), formas de reproducción y crecimiento en el cultivo. En 14,3% (2/14) de los pacientes se eliminó el parásito y en el resto, se observó disminución significativa del número por campo ($p < 0,05$), de la frecuencia de FCC ($p = 0,001$) y FGra ($p < 0,05$) y disminuyó la positividad del examen directo ($p < 0,001$). Estos resultados demuestran que el fármaco en dosis única, ocasionalmente erradicó a *B. hominis*, disminuyó la excreción de las formas vegetativas e indujo la aparición de quistes. Estos estudios deben continuarse.

Palabras claves: *Blastocystis hominis*, blastocistosis, secnidazol, antiprotosorios

Biological behavior of *Blastocystis hominis* in patients treated with Secnidazol (Unidazol®)

Abstract: *Blastocystis hominis*, classified as *Stramenopile*, is the most frequent intestinal parasite in humans. In feces and cultures, forms with a central body (FCB), granulose forms (FGra), as well as globulous and amoeboid forms in binary division or in cysts are seen. Its elevated prevalence, association with symptoms in humans, and lack of effective treatment, justified the evaluation of secnidazol (Unidazol® ZUOZ-PHARMA) in 14 individuals (7 males and 7 females) infected with *B. hominis*, with ages between 5-79 years, who were clinically and parasitologically evaluated before and after treatment, with one dose of the drug: 2 g for adults and 30 mg/Kg body weight for children. In feces serial examinations we evaluated morphology, number of parasites per microscopic field (400X), reproductive forms, and growth in culture. The study showed that in 14.3% (2/14) of patients the parasite was eliminated, and there was a significant decrease of the number per field ($p < 0.05$), of the FCB ($p = 0.001$) and of FGra ($p < 0.05$) frequency in the rest, as well as a decrease of positive direct examinations ($p < 0.001$). These preliminary results show that the drug in a single dose occasionally eradicated *B. hominis*, decreased the excretion of vegetative forms and induced the occurrence of cysts. These studies should be continued.

Keywords: *Blastocystis hominis*, blastocytosis, secnidazol, antiprotosozoa

* Correspondencia:

Email: carmen.guzman@ucv.ve

Introducción

Blastocystis hominis es el parásito intestinal humano de mayor prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, encontrando cifras hasta del 60% [1-4]. Ha sido clasificado

dentro del grupo *Stramenopile*, y también infecta reptiles, anfibios, aves y diversos mamíferos, siendo propuesta una posible transmisión antrozoonótica [5-8]. Desde principios del siglo XX se ha reportado la presencia de *B. hominis* en individuos asintomáticos y en personas con sínto-

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

mas gastrointestinales. Su presencia en las personas enfermas planteó la necesidad de considerarlo como patógeno [9-11]. Sin embargo, no fue sino hasta los numerosos estudios de Charles Zierdt [12-16] que se le prestó una mayor atención a los aspectos biológicos y la importancia clínica de este parásito. No obstante, a pesar de los adelantos obtenidos sobre este aspecto, no hay unanimidad de criterios sobre la patogenicidad de *B. hominis*, siendo reportadas manifestaciones clínicas que incluyen diarrea aguda con fiebre y malestar general, o diarrea leve con malestar epigástrico, náuseas y dolor abdominal [17-26]. En las heces se observan diferentes formas vegetativas que representan la capacidad del microorganismo de alimentarse y multiplicarse mediante eventos reproductivos dentro del intestino, las cuales tienen una diversidad morfológica y son identificadas como formas con cuerpo central (vacuolada) (FCC), granulosa (FGra) y ameboides (FAmeb) [5,16,27-30] formas globulosas (FGlob) [27] y formas lanceoladas e irregulares, observadas en cultivos [28]. Se transmite por medio de la forma quística [7,31] y la división binaria (DivB) es la forma de reproducción más frecuentemente observada en las heces y cultivos [28]. En cuanto a la frecuencia de aparición, las FCC y las FGra son las más frecuentes en las heces de personas asintomáticas; los quistes se encuentran principalmente en las heces de personas asintomáticas, las FAmeb y FGlob solamente se han visto en individuos sintomáticos [5,13,16,27-30] y todas estas variantes morfológicas también se observan en los cultivos [16,28,29]. Se han encontrado diferencias significativas en el número y formas observadas en las heces entre las personas sintomáticas y asintomáticas [32,33]. Las drogas más evaluadas contra *B. hominis* son los 5-nitroimidazoles, el trimetoprim sulfametoxazole, el 5-cloro-8-hidroxi-7-yodo-quinolona, la pentamidina y la furazolidona [7,18,19,21,24-26,37-41]. Los 5-nitroimidazoles son productos que comparten propiedades terapéuticas antiparasitarias y antibacterianas, que tienen una toxicidad selectiva para los organismos anaerobios o microaerófilos y para las células anóxicas o hipóxicas [7]. El metronidazol es uno de los 5-nitroimidazoles más utilizados en el tratamiento contra *B. hominis*, pero se ha observado cierta ineficacia en algunos individuos [38-41]. La mayoría de los 5-nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, ornidazol, cardinazol) requieren varios días de tratamiento y presentan efectos secundarios estomacales, lo cual conduce al incumplimiento del tratamiento por parte del paciente [34-39]. El tratamiento de la blastocistosis requiere de la disponibilidad de una droga eficaz y bien tolerada, con el fin de eliminar el riesgo de efectos secundarios y el consiguiente abandono del mismo por parte de los pacientes. El secnidazol fue el primer nitroimidazol eficaz indicado en una sola toma, contra tres géneros de protozoarios: *Entamoeba*, *Giardia*, y *Trichomonas*. Su larga vida media asegura concentraciones séricas eficaces durante al menos 72 horas, lo cual permite la administración en una sola dosis para los pacientes infectados. Experimentos realizados en ratas naturalmente infectadas con *B. hominis* y tratadas con 225 mg de secnidazol por Kg de peso, permitieron demostrar la eliminación del parásito en las heces en un 92% y a

partir de 150 mg/Kg de peso, disminuyó significativamente el número de *B. hominis* observados en las muestras recolectadas [36]. En cultivos polioxónicos de *B. hominis*, el secnidazol inhibió el crecimiento del mismo, demostrando mayor inhibición a medida que se aumentaba la concentración del fármaco [37]. La poca susceptibilidad del parásito a los medicamentos de elección para otros protozoarios y su elevada prevalencia en personas con o sin síntomas, justifican la realización de diversos estudios para conocer la eficacia de drogas como el Unidazol® (ZUOZ PHARMA) en la erradicación de este agente infeccioso.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del secnidazol (Unidazol® ZUOZ PHARMA) en su presentación microgranulada, sobre el comportamiento biológico de *B. hominis* en personas con y sin síntomas gastrointestinales.

Materiales y Métodos

Población

Se incluyeron en el estudio 14 personas, 7 del género masculino y 7 del femenino, con edades comprendidas entre 5 a 79 años a las cuales se les detectó la infección con *B. hominis*, sólo o asociado con protozoarios comensales, mediante un examen parasitológico seriado en tres muestras de heces. Los criterios de inclusión fueron: presentar o no síntomas gastrointestinales, peso mayor de 15 kg y haber aceptado participar en el estudio de forma voluntaria y a través del consentimiento informado [42]. Los criterios de exclusión fueron: valores elevados de transaminasas, niveles de hemoglobina por debajo de los valores normales de referencia, embarazo, madres que amamantan, tratamiento con anticoagulantes o la presencia de enfermedades crónicas como: cáncer, enfermedades hepáticas, alcoholismo, diabetes, enfermedad renal y retocolitis ulcerosa.

Medicamento y dosificación

UNIDAZOL® (secnidazol de ZUOZ PHARMA), es una presentación del secnidazol en forma de microgránulos recubiertos de nitrocelulosa para su administración oral, que logra enmascarar el sabor metálico del principio activo, lo cual junto a su presentación granulada y en dosis única favorece la administración y permite utilizarlo tanto en niños como en adultos [35]. Fue administrado por el médico durante la consulta respectiva: 2 gr para los adultos y 30 mg/kg para los niños. El medicamento fue administrado en combinación simultánea con yogurt firme, de acuerdo a la recomendación de la casa comercial, para enmascarar la presencia del medicamento.

Evaluación parasitológica

Se analizaron muestras de heces en tres días consecutivos una semana antes del tratamiento. Quince días después del tratamiento se repitió la evaluación, tomando en cuenta las recomendaciones del Subcommittee on Laboratory

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

Standard, Committee on Education, American Society of Parasitologist [43] y los criterios establecidos en el Laboratorio de Amibiasis de la Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela (UCV). A cada una de las muestras se le realizó examen directo en solución salina 0,85%, coloración con lugol, Quensel, Hematóxilina férrica y Ziehl-Neelsen (modificado), métodos de concentración de Kato y Ruggai, así como cultivo en medio de Boeck-Drbohlav (modificado) [44]. Este es un medio bifásico para cultivo polixénico, con una fase sólida constituida por huevo y sangre humana desfibrinada y una fase líquida que es un ringer; se esteriliza mediante tinalización y después de sembrar la muestra de heces se le agrega almidón de arroz estéril [44]. Los exámenes post-tratamiento permitieron evidenciar el efecto parasiticida del medicamento y el comportamiento biológico de *B. hominis*, el cual fue evaluado considerando las variantes morfológicas, número por campo de 400X y las formas de reproducción observadas en las heces y en el cultivo.

La acción del medicamento sobre el comportamiento biológico de *B. hominis* fue evaluada después del tratamiento, considerando el efecto sobre las diferentes variantes morfológicas observadas en las heces, ya que éstas son el reflejo del desarrollo del parásito dentro del intestino. Los parámetros fueron: detección del microorganismo en las heces mediante métodos parasitológicos (directo y cultivo), frecuencia de aparición de cada variante morfológica en las heces, número de parásitos por campo (400X) y reproducción en el cultivo a las 24, 48 y 72 hs.

Obtención de los datos y análisis estadístico

A los efectos de este trabajo, para evaluar el efecto del medicamento sobre el comportamiento biológico del parásito, el análisis estadístico y la representación gráfica de los mismos fue realizado considerando las observaciones de cada uno de los exámenes de heces realizados a los 14 pacientes, es decir 41 exámenes pretratamiento y 40 post-tratamiento.

Determinación del número de parásitos por campo

Para calcular el promedio de excreción de *B. hominis* a cada paciente, antes y después del tratamiento, en cada examen de heces se contó el número de formas vistas en diez campos de 400x y se reportó el promedio observado. Luego, se sumó cada uno de los promedios por examen y se dividió entre el número de ellos.

Para el análisis de la variación en el número antes y después del tratamiento se realizó la evaluación con la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon. Los datos expresados en frecuencias (%), se analizaron con la prueba exacta de Fisher.

Resultados y Discusión

Aunque muchos autores reportan que *B. hominis* puede ocasionar síntomas [9-12,18-26], ha sido difícil confirmarlo ya que la sintomatología es similar a la producida por otros agentes.

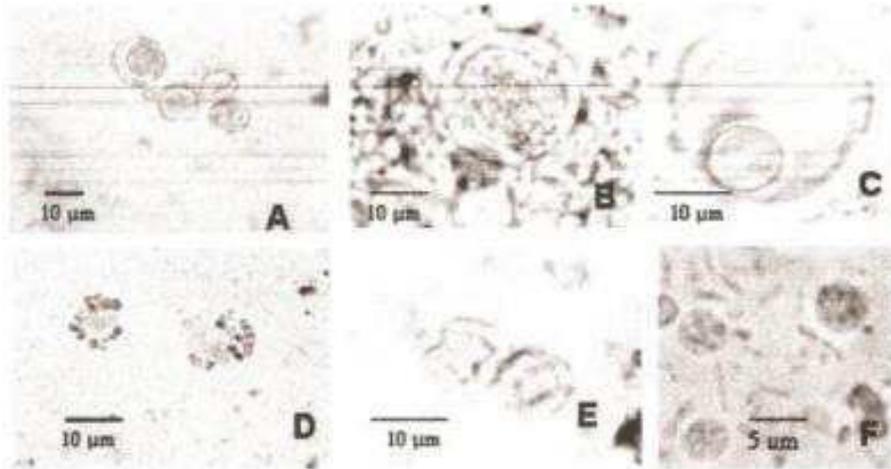


Figura 1. Variantes morfológicas de *B. hominis* observadas en heces de pacientes infectados. A. Formas con cuerpo central (Lugol, 400X). B. Forma granulosa (Lugol, 1000X). C. Forma amebicida (SS 0,85%, 1000X). D. Formas globulares (SS 0,85%, 400X). E. División binaria (Lugol, 400X). F. Quistes (Lugol, 1000X).

Uno de los criterios para considerar a *B. hominis* como un patógeno intestinal en pacientes sintomáticos, ha sido la presencia de 5 o más parásitos por campo de 400X en el

examen microscópico directo de las heces, en ausencia de otro patógeno intestinal [16], así como la observación de las FAmeh, FGlob y DivB [27,32,35]. En los exámenes

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

directos y cultivos de las heces de los pacientes antes del tratamiento, se observó una mayor frecuencia de las diferentes formas vegetativas de *B. hominis* (FCC, FGra, FGlob, FAmeb), lo cual ha sido previamente reportado [5,16,27,28,32] y a diferencia de otros reportes [30], los quistes (Figura 1) se observaron en baja proporción. Después del tratamiento, se observó una disminución de la frecuencia de aparición de las FCC ($p=0,001$) y FGra ($p<0,05$) asociadas con la desaparición de FAmeb, FGlob, DivB y el aumento de los quistes, sin ser estadísticamente significativo (Figura 2).

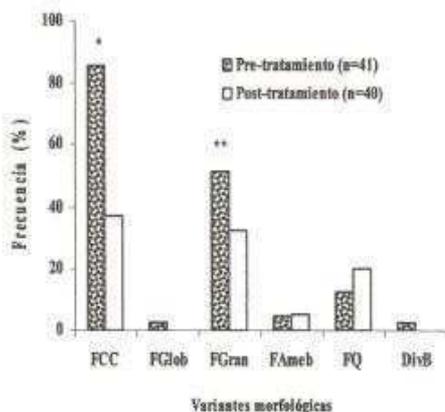


Figura 2. Frecuencia de las variantes morfológicas de *B. hominis* observadas en los exámenes directos de las heces de 14 pacientes, antes (n=41) y después (n=40) del tratamiento con secnidazol. * $p < 0,001$; ** $p = 0,042$ (Prueba exacta de Fisher) (FCC: forma con cuerpo central, FGlob: forma globulosa, FGra: forma granulosa, FAmeb: forma ameboides, FQ: forma quística, DivB: forma en división binaria).

Al evaluar el efecto parasiticida del secnidazol sobre *B. hominis* se encontró que sólo en el 14,3% (2/14) de los pacientes, no se observó el parásito en las heces después del tratamiento, por lo cual en las condiciones en que se realizó este trabajo, se evidencia la ineficacia para erradicar el parásito, como ha sido reportado para otros 5-nitroimidazoles [7,38-41]. Sin embargo, hubo una disminución significativa ($p=0,035$) de *B. hominis* al cuantificar el número de elementos por campo de 400X, en el examen directo de las heces de cada paciente después del tratamiento (Figura 3), siendo el promedio de 5,5 parásitos \pm 6,1 antes del tratamiento y 2,7 parásitos \pm 3,1 después del mismo. De acuerdo con estos resultados y en las condiciones del estudio, podríamos suponer que aunque el medicamento no induce una acción parasiticida significativa sobre *B. hominis*, si pudiera estar afectando el comportamiento biológico del parásito, probablemente actuando sobre su reproducción dentro del intestino, lo cual se demuestra en los cambios de las proporciones de las variantes morfológicas observadas en las heces. No obstante, para poder confirmar o negar la acción específica del medicamento sobre el parásito es necesario realizar estudios *in vitro*.

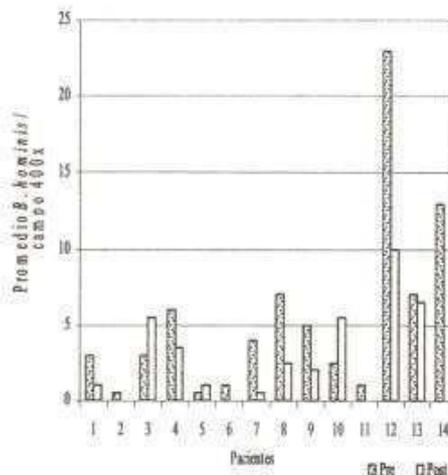


Figura 3. Promedio de *B. hominis* por campo de 400x, en las heces de cada uno de los 14 pacientes, antes y después del tratamiento con secnidazol. * $p=0,035$ (Prueba Rango de Signos de Wilcoxon).

En relación con los métodos empleados para el diagnóstico parasitológico de *B. hominis*, se observó que realizando el examen directo y cultivo en tres muestras, la positividad disminuyó después del tratamiento, siendo sólo estadísticamente significativo para el examen directo ($p<0,001$) (Figura 4). Se ha reportado que el examen directo de heces es sensible para el diagnóstico de este parásito [7,16,27,28,32,53] y en esta evaluación se observó como este método pierde eficacia cuando se examinan las muestras de heces después del tratamiento con una dosis de secnidazol, ya que hay una disminución del número de *B. hominis* por campo, a expensas de las formas vegetativas (FCC y FGra), y se incrementan las formas quísticas, que por ser muy pequeñas y poco conocidas presentan mayor dificultad para su identificación, lo cual podría conducir a una inadecuada interpretación del efecto de un medicamento contra *B. hominis*, al utilizar sólo el examen directo para la evaluación. Por ello es necesario utilizar el cultivo, el cual resultó ser un método más sensible para detectar la presencia de *B. hominis* en pacientes después del tratamiento.

Con estos resultados preliminares en estos 14 pacientes, se puede afirmar que el secnidazol en dosis única, ocasionalmente erradicó a *B. hominis* y disminuyó la excreción del parásito bajo sus formas vegetativas, e indujo la aparición de quistes, por lo cual en esta situación se convierten en una fuente de infección para otros hospederos. De acuerdo a estos resultados, se recomienda la evaluación parasitológica post-tratamiento, con un mínimo de tres muestras de heces, mediante el examen directo y el cultivo en el medio de Boeck-Drbohlav (modificado) y adicionalmente se sugiere que el bioanalista responsable del diagnóstico microscópico se entrene en la morfología de *B.*

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25

hominis, para evaluar con certeza la persistencia o no del parásito después del tratamiento.

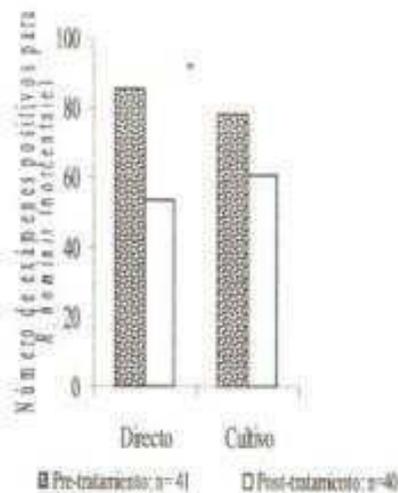


Figura 4. Detección de *B. hominis* en las heces de 14 pacientes pre y post-tratamiento con Secnidazol, mediante examen directo y cultivo en el medio Biocod-Diobolav (mod). *; Diferencia estadística entre el examen directo pre y post-tratamiento; $p < 0.001$ (Prueba Exacta de Fisher).

Agradecimiento

Agradecimiento especial a la profesora Eva Pérez de Suárez por la asesoría al proyecto y las correcciones y sugerencias hechas al presente artículo. Al Dr. Oswaldo Carmona por su valiosa colaboración en la revisión del artículo y por las oportunas sugerencias.

Financiamiento: CDCH-UCV PI-090058002005 y parcialmente por LABORATORIO ZUOZ PHARMA.

Referencias

- Biolley MA, Oberg C. Blastocystosis en pacientes sintomáticos del hospital regional de Temuco-Chile. Bol Chil Parasitol 1993; 48:25-7.
- Pérez de Suárez E, Nessi Paduani A, Pérez Schuel I, Mariño M, Niño E, Rómer H, Gerardi García A. *Blastocystis hominis* en niños con gastroenteritis estudiados en dos centros hospitalarios pediátricos de Caracas. Junio 1993- Julio 1994. Arch Ven Pueril Ped 1997; 60:160-7.
- Requena I, Hernández Y, Ramsay M, Salazar C, Devera R. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en vendedores ambulantes de comida del municipio Caroní, estado Bolívar, Venezuela. Cuad Salud Pública 2003; 19:1721-7.
- Amato Neto V, Rodríguez Alarcón RS, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, Dos Santos AG. *Blastocystis*: a high proportion of cases found in schoolchildren of Sao Paulo, state of Sao Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37:354-6.
- Bordiam PFI, Stensel DJ. *Blastocystis* in human and animals: morphology, biology and epidemiology. Adv Parasitol 1993; 32:1-70.
- Abe N, Nagishi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pigs, and zoo animals. Vet Parasitol 2002; 106:203-12.
- Tan K. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. Parasitol Vet 2004; 126:121-44. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CJ. Human parasite finds taxonomic home. Nature 1996; 380:398.
- Yakimoff WL, Wasilewsky WJ. Azatejet de la Blastocystose. Bull Soc Pathol Exot 1925; 18:130-2.
- Ponayotaton Par, NME. Sur la Blastocystose. Trois cas d'enterite a *Blastocystis hominis*. Bull Soc Pathol Exot 1928; 21:755-60.
- Maplestone PA. Human intestinal protozoan in North Queensland. Ann Trop Med Parasitol 1920; XIV:283-93.
- Zierdt CH, Rude W, Boll B. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J Clin Pathol 1967; 48:465-501.
- Zierdt CH, Tan HZ. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. Parasitescr 1976; 59:277-83.
- Phillips BP, Zierdt CH. *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. Exp Parasitol 1976; 39:358-64.
- Zierdt CH. *Blastocystis hominis* a long misunderstood intestinal parasite. Parasitol Today 1988; 4:15-7.
- Zierdt CH. *Blastocystis hominis*. Past and Future. Clin Microbiol Rev 1991; 4:61-79.
- Mc Clure HM, Strobert EA, Healy GR. *Blastocystis hominis* in a pig tailed macaque: a potential enteric pathogen for nonhuman primates. Lab Animals Sci 1980; 30:890-4.
- Vannatta JB, Adanson D, Mullican K. *Blastocystis hominis* infection presenting as recurrent diarrhea. Ann Intern Med 1985; 102:495-6.
- Sheehan DJ, Rauch ER, Mac Kinnon JC. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. J Clin Microbiol 1986; 24:548-50.
- Diazok BJ, Rrvai J. Diarrhoea due to *Blastocystis hominis*: an old organism revisited. South Med J 1987; 80:1-32.
- Gallager LG, Vanglarsick JS. *Blastocystis hominis* enteritis. J Ped Infect Dis 1987; 4:556-7.
- Russo AB, Stone SL, Taplin ME, Snapper HJ, Doern GV. Presumptive evidence for *Blastocystis hominis* as a cause of colitis. Arch Intern Med 1988; 148:1064.
- Rosenblatt JE. *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol 1990; 28:2379-80.
- Wilson KW, Winget D, Wilks S. *Blastocystis hominis* infection: Signs and symptoms in patients at Wilford Hall Medical Center. Mil Med 1990; 155:394-6.
- Tungtranchitr A, Manatsathit S, Kositchaiwat C, Ongrecharakun J, Markong N, Chinabarti P. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004; 35:705-10.
- Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rosolini A. Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. Lancet 1989; 2:1394.
- Pérez de Suárez E, Guzmán de Rondón C. La morfología del *Blastocystis hominis* en las heces y evaluación de métodos parasitológicos. GEN 1994; 48:226-31.
- Guzmán de Rondón C. Variantes morfológicas de *Blastocystis hominis* en heces humanas y cultivos axénicos. Descripción y morfometría. Trabajo de ascenso presentado ante la Facultad de Medicina para optar al escalafón universitario de Profesor Asistente. 1995.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 914115

Código de verificación: q1m4G8RK

Firmado por:	Fecha:
CAROLINA MERCEDES WAGNER ABUCHAIBE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 11:46:38
JACOB LORENZO MORALES UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 12:40:27
ENRIQUE MARTINEZ CARRETERO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	25/05/2017 15:53:39
BASILIO VALLADARES HERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	26/05/2017 10:35:13
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	01/06/2017 13:54:25