

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Aplicación de la técnica de Rapd para la caracterización
de especies de género Acanthamoeba**

Autor: Ortega Rivas, Antonio

**Directores: Antonio del Castillo Remiro
y Fernando de Armas Hernández**

Departamento de Parasitología, Ecología y Genética



UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
Dpto. de Parasitología, Ecología y Genética
Facultad de Farmacia
Avda. Astrofísico F. Sánchez, s/n
38071 La Laguna, Tenerife, España
Tlfno.(922) 318484 Fax (922) 318514

D. Antonio del Castillo Remiro, y D. Fernando de Armas Hernández codirectores de la Tesis Doctoral “ APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE RAPD PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO ACANTHAMOEBA” realizada por D. Antonio Ortega Rivas

INFORMAN:

Que la mencionada Tesis Doctoral ha sido realizada, en su totalidad, en los laboratorios del Departamento de Parasitología, Ecología y Genética de la Universidad de la Laguna. Y 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 para el inicio de los trámites de su presentación, emitimos un informe favorable.

En La Laguna a diecinueve de diciembre de dos mil dos.



UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
Dpto. de Parasitología, Ecología y Genética
Facultad de Farmacia
Avda. Astrofísico F. Sánchez, s/n
38071 La Laguna, Tenerife, España
Tlfno.(922) 318484 Fax (922) 318514

JOSÉ MARÍA FERNÁNDEZ-PALACIOS MARTÍNEZ, PROFESOR TITULAR DE ECOLOGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA Y GENÉTICA.

CERTIFICA:

Que dado el indudable interés que ha tenido para este Departamento la realización del trabajo de investigación conducente a la obtención del grado de Doctor en Farmacia, comprobando el alto valor científico del mismo, de Departamento de Parasitología, Ecología y Genética, da su conformidad para la presentación de la Memoria realizada por D. Antonio Ortega Rivas con el título “Aplicación de la técnica de RAPD para la caracterización de especies del género *Acanthamoeba*”.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en La Laguna a diecinueve de diciembre de dos mil dos.

A mis padres, Julio y Felicitas,
mi modelo a seguir;
a mis hermanos, Paco y Julio,
por ayudarme a remar sin descanso;
a mi esposa Elena,
mi mejor compañera de viaje.

... y a mi diabetes,
esa llave de la que
no me puedo olvidar.

1.- INTRODUCCIÓN.-	1
1.1.- Generalidades de <i>Acanthamoeba</i>	1
1.1.1.- Distribución.	3
1.1.2.- Ciclo de vida.	4
1.1.3.- Características de los trofozoítos.	5
1.1.4.- Características de los quistes.	6
1.1.5.- Asociaciones con bacterias.	10
1.2.- Clasificación taxonómica.....	12
1.2.1.- Clasificación morfológica.....	13
1.2.2.- Otras clasificaciones.	14
1.3.- Presencia de especies de <i>Acanthamoeba</i> en el hombre.	16
1.3.1.- Mecanismo de infección.	16
1.3.2.- Respuesta inmune.	20
1.4.- Infecciones causadas por <i>Acanthamoeba</i>	21
1.4.1.- Infecciones diseminadas.	22
1.4.2.- Úlceras cutáneas.	22
1.4.3.- Encefalitis Granulomatosa Amebiana.....	25
1.4.4.- Queratitis por <i>Acanthamoeba</i>	28
1.4.4.a.- Características clínicas.	31
1.4.4.b.- Tratamiento.	33
1.5- Profilaxis.....	36
1.6.- Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD).	36
1.6.1.- Mecanismo de amplificación de los RAPD.	38
1.6.2.- Repetitividad del método RAPD.	39
1.6.2.- Aplicaciones de la técnica RAPD.	40
2.- OBJETIVOS.-	43
3.- MATERIALES.-	47
3.1.- Soluciones y tampones.	47

3.2.- Medios de cultivo.....	48
3.2.1.- Medio de cultivo ATCC 712 PYG.....	48
3.2.2.- Medio salino de Neff modificado para amebas.....	49
3.2.3.- Solución modificada de Neff y Band (Page, 1967).....	49
3.2.4.- Medio AX2 modificado por S.K. Maciver.....	49
3.2.5.- Medio de crecimiento PPG.....	50
3.2.6.- Medio de axenificación de <i>Acanthamoeba</i>	50
3.2.7.- Medio Agar base 2 ‰.....	51
3.2.8.- Medios de cultivos bacterianos.....	51
3.3.- Antibióticos.....	51
3.4.- Antifúngicos.....	51
3.5.- Enzimas.....	51
3.6.- Vector de transformación.....	52
3.7.- Cepas bacterianas.....	52
3.8.- Cepas de <i>Acanthamoeba</i>	53
3.9.- Aislados de amebas de vida libre.....	54
3.10.- Patrones de peso molecular para electroforesis de ADN.....	55
3.11.- Oligonucleótidos sintéticos.....	56
4.- MÉTODOS.-	58
4.1. Cultivos de <i>Acanthamoeba</i>	58
4.1.1.- Cepas adquiridas del <i>American Type Culture Collection</i>	58
4.1.2.- Cepas adquiridas del <i>Culture Collection of Algae and Protozoa</i>	58
4.1.3.- Aislados de estuches portales.....	59
4.1.4.- Aislados de lentes de contacto.....	59
4.1.5.- Aislados de córneas.....	59
4.1.6.- Aislado de ganglio linfático.....	60
4.1.7.- Aislado de pulmón.....	60

4.2.- Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	60
4.3.- Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	61
4.3.1.- Aislamiento de ADN genómico de <i>Acanthamoeba</i>	61
4.3.2.- Aislamiento de ADN plasmídico	62
4.4.- Purificación de productos amplificados por PCR.....	63
4.4.1.- Purificación desde geles de agarosa de bajo punto de fusión	63
4.4.2.- Purificación desde geles de agarosa.....	64
4.4.3.- Purificación de productos de amplificación por PCR directamente de la mezcla de reacción.	64
4.5.- Cuantificación de ácidos nucleicos.....	64
4.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	65
4.7.- Electroforesis de ácidos nucleicos	66
4.7.1.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa	67
4.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y urea	67
4.8.- Inmovilización de ácidos nucleicos	68
4.8.1.- <i>Southern blot</i>	68
4.8.1.- <i>Dot blot</i>	70
4.9.- Marcaje de sondas	70
4.9.1.- Marcaje de sondas con digoxigenina empleando <i>Taq</i> polimerasa	70
4.9.2.- Marcaje de sondas con digoxigenina empleando <i>Klenow</i>	71
4.10.- Hibridación ADN:ADN con sondas marcadas con digoxigenina.....	71
4.11.- Detección inmunológica del producto hibridado.....	72
4.12.- Ligación.....	73
4.13. Transformación de ADN de <i>Acanthamoeba</i> en <i>E. coli</i>	73
4.13.1.- Preparación de <i>E. Coli</i> competentes	73
4.13.2.- Transformación de células bacterianas competentes	74

4.13.3.- Selección de los clones recombinantes de <i>E. coli</i>	75
4.13.4.- Análisis de los tamaños de los fragmentos clonados.....	75
4.14.- Secuenciación de ADN.....	76
4.15.- Diseño de cebadores a partir de los fragmentos seleccionados.....	77
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.-	81
5.1.- Patrones genéticos obtenidos con los diferentes patrones RAPD.....	81
5.2.- Análisis de los patrones de amplificación RAPD.....	88
5.2.1.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-14.....	88
5.2.2.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-15.....	88
5.2.3.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-18.....	89
5.2.4.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-20.....	89
5.2.5.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-1.....	89
5.2.6.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-3.....	90
5.2.7.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-6.....	90
5.2.8.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-19.....	90
5.3.- Resultados de los patrones obtenidos con las amplificaciones con los diferentes cebadores RAPD.....	90
5.4.- Purificación de los productos amplificados mediante RAPD de las distintas especies de <i>Acanthamoeba</i>	92
5.5.- Análisis de los tamaños de los fragmentos clonados.....	93
5.5.1.- Análisis de los fragmentos de la cepa 50238 de <i>A. divionensis</i>	93
5.5.2.- Análisis de los fragmentos de la cepa 30901 de <i>A. astronyxis</i>	94
5.5.3.- Análisis de los fragmentos de la cepa 30461 de <i>A. polyphaga</i>	95
5.6.- Secuenciación de los fragmentos clonados.....	96
5.7.- Análisis de las secuencias de los fragmentos seleccionados.....	97
5.8.- Estudio de especificidad de los fragmentos aislados.....	98
5.8.1.- A partir del amplificado de <i>A. divionensis</i> con el cebador OPC-14.....	99
5.8.2.- A partir del amplificado de <i>A. astronyxis</i> con el cebador OPC-20.....	100

5.8.3.- A partir del amplificado de <i>A. polyphaga</i> con el cebador OPC-20.	102
5.9.- Diseño de cebadores a partir de los fragmentos seleccionados.	103
5.9.1.- Diseño de cebadores de <i>A. astronyxis</i>	104
5.9.2.- Diseño de cebadores de <i>A. divionensis</i>	106
5.9.3.- Diseño de cebadores de <i>A. polyphaga</i>	108
5.10.- Identificación de las distintas cepas.	111
5.11.- Determinación específica de <i>Acanthamoeba</i>	113
5.11.1.- Aislados procedentes de estuches portales.	113
5.11.2.- Aislados de <i>Acanthamoeba</i> procedentes de muestras biológicas.	115
5.11.2.a.- Aislados a partir de raspados corneales.	116
5.11.2.b.- Aislado a partir de biopsia pulmonar.	117
5.11.2.c.- Aislado a partir de ganglio linfático.	119
5.11.3.- Estudio de <i>Acanthamoeba</i> en líquido cefalorraquídeo (LCR).	120
6.- CONCLUSIONES.-	125
7.- ANEXOS.-	129
7.1.- ANEXO I.	129
7.1.1.- Secuencia del fragmento de <i>A. divionensis</i> de 370 pb.	129
7.1.2.- Secuencia del fragmento de <i>A. astronyxis</i> de 613 pb.	130
7.1.3.- Secuencia del fragmento de <i>A. astronyxis</i> 485 pb.	131
7.1.4.- Secuencia del fragmento de <i>A. polyphaga</i> 530 pb.	132
7.1.5.- Secuencia del fragmento de <i>A. polyphaga</i> pb.	133
7.1.6.- Secuencia del fragmento de <i>A. polyphaga</i> 962 pb.	134
7.2.- ANEXO II:	135
7.2.1.- Resultados de los líquidos cefalorraquídeos estudiados.	135
7.3.- ANEXO III:	136
7.3.1.- Historia clínica del paciente BCN-2.	136
7.3.2.- Historia clínica del paciente BCN-7.	137
7.3.3.- Historia clínica del paciente LCR-19.	138
8.- BIBLIOGRAFÍA.-	139

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- Generalidades de *Acanthamoeba*.

A las amebas, por lo general, se les conoce como a organismos de forma cambiante. Dentro de ellas, hay un grupo, el de las amebas de vida libre, que hasta hace unas décadas, no parecía interesar más que a los especialistas más estrictos y, en la actualidad, se sabe que algunos de sus representantes, como son las especies de *Acanthamoeba*, afectan al hombre y pueden causarle graves patologías.

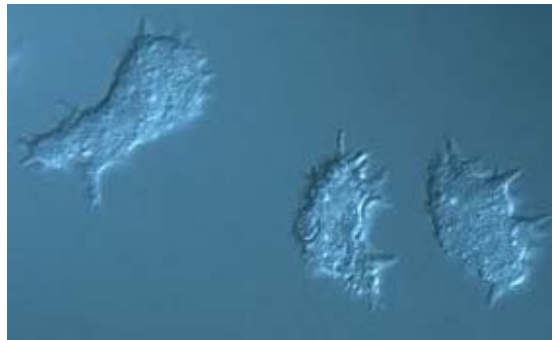


Figura 1: Trofozoítos de *Acanthamoeba* (Kihara, 12).

En 1903, Schaudin había descrito a *Entamoeba histolytica* como la única ameba patógena para el hombre. Unos años más tarde, en 1958, Culbertson aisló, a partir de un cultivo de células de riñón de mono, un nuevo agente patógeno desconocido hasta el momento. Se trataba de una ameba diferente de las parásitas del intestino, que clasificó como *Acanthamoeba culbertsoni*. Ésta era capaz de producir un efecto citopatógeno en cultivos celulares y, una vez inoculada por vía intranasal o intracerebral a ratones, les producía una meningoencefalitis mortal, que se desarrollaba en pocos días (Culbertson y col., 1958-1959).

Poco después, en 1965, Fowler y Carter describieron en Australia cuatro casos de meningitis mortal en humanos e identificaron al agente patógeno causal, como una *Acanthamoeba* similar a la descrita por Culbertson. Un año más tarde, en 1966, Butt aisló y cultivó, a partir de un caso de meningoencefalitis humana mortal, una ameba cuya identificación aportó nuevos elementos, ya que, en este caso, a pesar de que se trataba también de una ameba de vida libre, era diferente a las anteriormente descritas, quedando englobada dentro del género *Naegleria* (Butt, 1966).

Llegados a este punto, se vio que perdía validez el concepto de Schaudin cuando afirmaba que la única ameba patógena para el hombre era *E. histolytica*, puesto que se empezaba a conocer la existencia de otros tipos de amebas que podían causar patologías en el hombre.

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* se han aislado en una amplia variedad de hábitats y su contacto con el hombre es un hecho aparentemente común. Se ha observado que, hasta un 50 % de la población, posee anticuerpos específicos frente a *Acanthamoeba* (Cursons, 1980; Cerva, 1989), siendo aisladas en la nariz y garganta de individuos asintomáticos (Rivera y col., 1984).

Las patologías que provoca *Acanthamoeba* están relacionadas con los tejidos que son capaces de colonizar. Pueden invadir el sistema nervioso central, provocando una meningitis denominada Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA). Pueden también encontrarse formando ulceraciones en la piel o invadiendo la córnea, provocando queratitis oculares. En pacientes inmunodeprimidos, se han descrito casos en los que provocan infecciones diseminadas (Murakawa y col., 1995).

Las especies del género *Acanthamoeba* están relacionadas entre sí básicamente: en su biología celular, sus relaciones con el medio ambiente, su crecimiento, su multiplicación y enquistamiento, o sus cambios macromoleculares, en función del tipo de medio bioquímico en el que se desarrollen, además de su potencial como productores de enfermedades.

1.1.1.- Distribución.

Desde el descubrimiento de estas amebas, en 1958, se han llevado a cabo un gran número de trabajos, cuya finalidad es establecer su distribución en la naturaleza. Esto nos ha permitido conocer la gran cantidad de hábitats donde se pueden encontrar, en los que se incluye agua dulce y salada. Así han podido ser aisladas de piscinas, conductos de calefacción y de ventilación, suelos, agua mineral embotellada, aire, balnearios, acuarios, vegetales, sedimentos marinos, lodos procedentes de aguas residuales. Además se han identificado en unidades de diálisis, polvo en suspensión, medios de cultivo de bacterias o células, lentes de contacto, sus estuches y soluciones para el cuidado de las mismas e, incluso en dispositivos intrauterinos (DIU). En el hombre, se han encontrado en la nariz y tráquea de pacientes con las vías respiratorias afectadas, secreciones bronquiales, oídos y en muestras de deposición de pacientes con diarreas (Visvesvara & Stehr-Green, 1990; Sadaka & Emam, 2001). También se han aislado en la garganta y en la mucosa nasal de individuos sanos, por lo que se puede llegar a pensar que estas amebas forman parte de su flora normal (Martínez, 1991).

Su presencia en aguas dulces de superficie, donde se engloban a las aguas de ríos, fuentes, lagos, aguas de abasto público y aguas de piscinas, representa un riesgo para la salud humana, ya que el contacto con éstas es la principal vía de contagio (Vesaluoma y col., 1995). Han sido observadas diferencias estacionales en su densidad, siendo en primavera y otoño cuando se las encuentra en mayores concentraciones, lo que parece estar relacionado con la aparición de los síntomas de queratitis por *Acanthamoeba*, en los meses más cálidos del año (John & Howard, 1995; Mathers y col., 1998).

Las especies de *Acanthamoeba*, como amebas de vida libre que son, no son parásitas *per se*, en contraste con lo que ocurre con otros muchos protozoos amebianos, por lo que no necesitan ningún tipo de hospedador para su desarrollo. Su presencia en el hombre es completamente accidental, siendo las patologías a las que se le asocian, raras y oportunistas.

Cuando se encuentran de forma libre, se alimentan de bacterias, hongos, otros protozoos y algunas cianobacterias (Bowe & Sawyer, 1979; Dryden & Wright, 1987); actúan como fagotrofos móviles en las superficies aerobias de los suelos y sedimentos (De Jonckheere, 1991). Si llegado el caso, invaden un organismo, éstas se nutren de los tejidos que colonizan de su hospedador (De Jonckheere & Van de Vorde 1977; Armstrong, 2000).

1.1.2.- Ciclo de vida.

El ciclo de vida de las especies de *Acanthamoeba* se desarrolla en dos fases: una fase trofozoítica en la que *Acanthamoeba* se alimenta y multiplica de forma activa y que es la fase invasiva ; y una fase quística o de resistencia, que adquiere cuando las condiciones del medio no le son favorables (Figura 2).

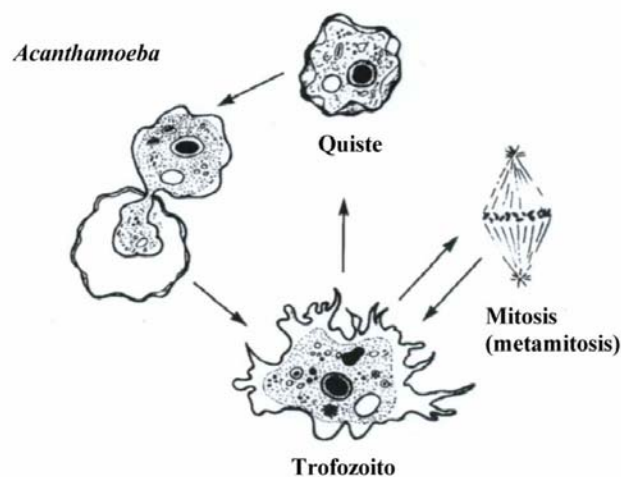


Figura 2: Ciclo biológico de *Acanthamoeba*.

1.1.3.- Características de los trofozoitos.

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* tienen un tamaño de entre veinticinco y cuarenta micras, poseen poca movilidad, presentan un núcleo con un único nucleolo grande y prominente, un citoplasma abundante y granuloso, con una vacuola pulsátil citoplasmática contráctil, que se observa como un círculo refringente, que aumenta de tamaño lentamente y se cierra de forma brusca. Durante su movimiento, se puede observar como unos pseudópodos, finos y delgados, a modo de espinas, que reciben el nombre de acantópodos, se extienden lentamente, en su desplazamiento. En cultivo sólido en placa, aparecen como pequeñas masas, más o menos evidentes, y sin que pueda apreciarse su forma de manera precisa. *Acanthamoeba*, a diferencia de lo que ocurre con otras especies de amebas de vida libre, no presenta formas flagelares (Preston & King, 1984).

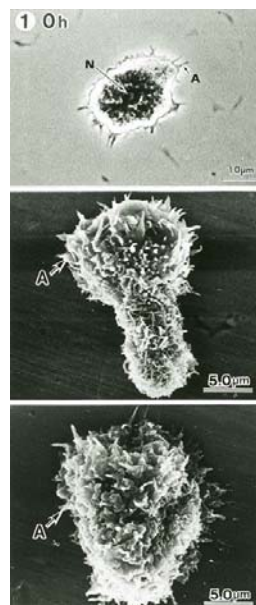


Figura 3: Trofozoíto *Acanthamoeba* spp. N: núcleo, A: acantópodo (Nagata, 21).

Son organismos aeróbicos, aunque sus trofozoítos pueden adaptarse a ambientes con baja presión parcial de oxígeno, durante un corto periodo de tiempo (Lloyd y col., 1983), o a un ambiente anóxico, durante unas horas (Turner y col., 1997; Thomas y col., 1998).

1.1.4.- Características de los quistes.

Cuando los trofozoítos de *Acanthamoeba*, tanto de forma natural como *in vitro*, se encuentran en situaciones de anoxia, carencia de nutrientes durante unos días o en medios con concentraciones de magnesio por encima de 50 mM, evolucionan a su forma de resistencia y forman un quiste, (Chagla & Griffiths, 1974). La forma quística le confiere a la ameba resistencia frente a la desecación, temperaturas extremas y agentes químicos (Neff & Neff, 1969; Biddick y col., 1984; Brandt y col., 1989; Ludwig, y col., 1986; Kilvington, 1990). El enquistamiento puede ser inducido, además, con el empleo de ciertos inhibidores, como la mitomicina C, que es un inhibidor de la síntesis de ADN, el cloranfenicol, que inhibe la síntesis de proteínas, o el 2,4-dinitro-fenol, que impide la formación de ATP (Neff & Neff, 1972). Distintas variaciones en las condiciones físicas del medio provocan también el enquistamiento, como el calor húmedo o el frío extremo (estrés térmico), la desecación y los cambios en la osmolaridad del medio (Cordingley y col., 1996). *Acanthamoeba* puede permanecer en este estado de latencia durante años y seguir siendo viable; si se expone a los quistes en un medio que les sea favorable, donde encuentren alimento, volverán a recuperar su forma activa de trofozoíto (Mazur y col., 1995).

Los quistes presentan una gran variedad de formas, pero todos ellos poseen una serie de aspectos que los caracterizan: su tamaño es ligeramente menor que el de los trofozoítos (entre quince y veintiocho micras), contienen un solo núcleo (aunque excepcionalmente poseen dos), tienen una pared compuesta por dos envolturas, más o menos separadas, la exina y la intina. La intina, la más interna, se adhiere muy estrechamente al protoplasma, formando lo que se denomina endoquiste, dando al quiste una estructura poligonal. La exina,

la más externa, se encuentra más o menos plegada y forma, alrededor de la intina, un velo poco refringente, que es el exoquiste. En las uniones entre ambas envolturas se forman los ostiolos u orificios de salida. Cada ostiolo posee un opérculo, que es arrancado en el momento del desenquistamiento y la abertura que se genera es empleada por los trofozoítos para abandonar su envoltura quística (Pussard & Pons, 1977).

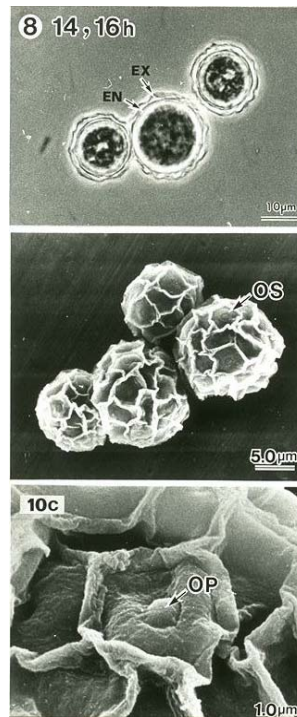


Figura 4: Estructura del quiste. EX: exoquiste, EN: endoquiste, OS: ostiolo, OP: opérculo (Nagata, 28)

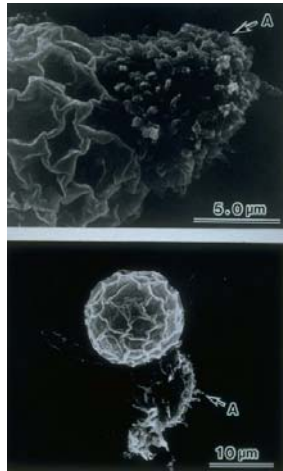


Figura 5: Desenquistamiento. A: acantópodo (Nagata, 36).

Los receptores implicados y los mecanismos que se desencadenan en la formación del quiste, todavía están siendo investigados. La información más detallada que se posee se ha obtenido de sistemas donde se les ha sometido a condiciones de carencia de nutrientes o adición de cloruro de magnesio en el medio de cultivo, lo que provoca una acumulación de células en fase G₂, favoreciendo, así, la aparición de la cubierta quística (Byers y col., 1991). Las primeras descripciones sobre los procesos de enquistamiento mostraban que, en las fases iniciales, se producían una serie de cambios dinámicos extremos, donde se observaba una producción masiva de multitud de componentes, como organelas y sistemas de membrana celular (Griffiths & Hughes, 1969), y donde se comprobaba que uno de los prerrequisitos esenciales, para el establecimiento de la estructura del quiste, era una rápida autofagia (Bowers & Korn, 1969). Uno de los componentes presentes en el proceso de enquistamiento es la celulosa, que no se observa cuando la ameba se encuentra en su estado de trofozoíto y que comienza a aparecer a partir de las 20 horas de la estimulación del enquistamiento. También se observa que disminuyen las concentraciones de proteínas, como

la actina, y la síntesis y traducción de ARN mensajero (Chagla & Griffiths, 1974; Rubin & Maher, 1976) y que, cuando se forma es quiste, estos niveles son aún menores (Lloyd y col., 2001). También se producen cambios en las concentraciones de algunos lípidos, pero sin provocar cambios en la composición total de ácidos grasos (Khunkitti y col., 1998).

Otro de los mecanismos críticos en el proceso de enquistamiento es el metabolismo de las poliaminas. Se ha observado que la inhibición de la ornitina descarboxilasa bloquea el proceso de formación del quiste (Kim y col., 1987). La inhibición de distintas enzimas de este metabolismo no conduce siempre a un descenso de las poliaminas, debido a que las enzimas no son completamente específicas y poseen más de una diana (Sands y col., 1985). En el caso de las diamidinas, se ha observado que son inhibidoras del crecimiento trofozoítico y, si se emplean a altas concentraciones y durante largas exposiciones, inhiben también el proceso de enquistamiento. Si, por el contrario las dosis son bajas, se produce el efecto contrario, induciéndose el enquistamiento de la ameba. Este hecho es de gran importancia y debe ser considerado a la hora de establecer protocolos de tratamiento, en el caso de infecciones amebianas (Turner y col., 1999).

La viabilidad de los quistes de *Acanthamoeba* tanto en el medio ambiente natural, como en el laboratorio, almacenadas en agua a 4° C, es de aproximadamente 25 años, manteniendo, por lo menos las cultivadas in vitro, sus capacidades invasivas durante unos ocho años. Se asume que, en el medio natural, la virulencia se mantiene pasados estos 25 años (Mazur y col., 1995; Sadhna y col., 1999). La patogenicidad de *Acanthamoeba* se ve disminuida en torno a un 40 %, cuando ésta se somete a periodos de criopreservación superiores a 5 años. Por el contrario, la ameba de vida libre *N. fowleri*, durante los primeros 30 meses de congelación, ve incrementada su virulencia (John & John 1996).

1.1.5.- Asociaciones con bacterias.

Las amebas de vida libre, para su alimentación, emplean la fagocitosis, siendo capaces de ingerir bacterias completas, actuando en la naturaleza como controladores de muchas poblaciones bacterianas. Las vacuolas digestivas se forman en la parte anterior, a partir de unos pseudópodos cortos, romos y curvos que rodean a la presa, originando una cavidad circular denominada *food-cup* o copa de alimentación (Figura 6) (Moore y col, 1991).

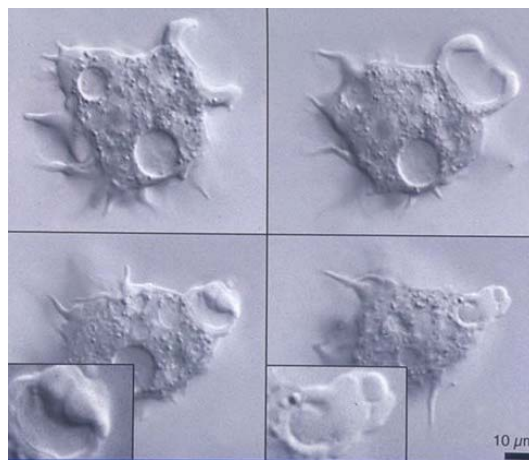


Figura 6: Formación de la copa de alimentación (Kihara, 34).

En ocasiones, algunos de los organismos ingeridos por la ameba son capaces de evadir la lisis en el interior del fagosoma y mantenerse viables en su interior. La bacteria sobrevive en el interior de la ameba, pudiendo establecer con ella diferentes grados de relación, tanto simbióticas como parásitas y, en ocasiones, incluso llegar a causar la muerte de la ameba. Dentro de las estrategias que las bacterias emplean para sobrevivir en el interior de las amebas, se incluye la formación de esporas o quistes de resistencia y/o desarrollo de

rutas metabólicas alternativas; lo que les permite sobrevivir y multiplicarse en el nuevo nicho, donde va a obtener protección del medio externo y nutrientes, desarrollando nuevas características y adaptándose a las nuevas condiciones ambientales (Winiecka-Krusnell & Linder, 2001).

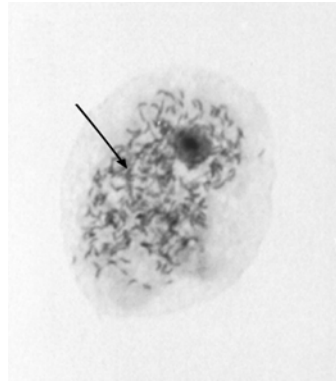


Figura 7: Trofozoíto de *Acanthamoeba* en simbiosis con bacilos bacterianos.

La presencia de bacterias en el interior de *Acanthamoeba* se ha identificado con igual frecuencia, tanto en amebas aisladas del medio ambiente, como en amebas aisladas en humanos. Aproximadamente a un 25% de los aislados de *Acanthamoeba* se las ha asociado con bacterias con las que convive en obligada endosimbiosis. Existen determinadas bacterias Gram-negativas que se encuentran tan adaptadas al citoplasma amebiano, que no se pueden cultivar fuera de él. Tanto la clasificación taxonómica de estas bacterias, como su potencial papel en la contribución a la virulencia de las cepas es desconocida (Fristche y col., 1993).

A la hora de elegir a sus hospedadores, estas bacterias simbióticas son bastante selectivas y tan sólo colonizan a ciertos tipos de *Acanthamoeba*. Dentro de las bacterias intracelulares de alto interés sanitario encontradas en su interior, destacan *Legionella*, *Burkholderia*, *Chlamydia* y *Rickettsia*, que tienen la capacidad de introducirse en el interior del trofozoíto y ser resistentes, así, a los métodos de desinfección habituales y reproducirse

en su interior, incluso cuando la ameba adquiere su forma de resistencia, por lo que las amebas son un mecanismo importante en la persistencia y desarrollo de estos organismos en el medio ambiente y deben considerarse tanto la importancia clínica como epidemiológica de las infecciones que pueden portar (Rowbotham, 1980; Tyndall & Domingue, 1982; Kilvington & Price, 1990). La infectividad de las amebas de vida libre no se ve alterada por la presencia de estas bacterias (Fritsche y col., 1993).

La inhalación de *Legionella* cuando se encuentra en el interior de *Acanthamoeba*, produce patologías más severas de legionelosis, ya que se potencia el crecimiento intrapulmonar de *L. pneumophila*, provocando una mayor mortalidad que cuando se produce la inhalación de *Legionella* sola. El mecanismo de crecimiento intrapulmonar de *Legionella* en el interior de la ameba está aún por determinar aunque, *in vitro*, se ha demostrado que la presencia de la ameba provoca que decaiga la respuesta inmune del hospedador (Barker y col., 1995-a).

Esta asociación bacteria-ameba va a provocar la pérdida de susceptibilidad a ciertos antibióticos, como ocurre en el caso de *L. pneumophila* y *Mycobacterium avium* cuando infectan a especies de *Acanthamoeba*. El mecanismo por el que adquieren este tipo de resistencia es desconocido, además de no existir evidencias de que estos fenotipos puedan mantenerse fuera de la ameba (Barker y col., 1995-b; Miltner & Bermúdez, 2000;).

La flora bacteriana externa es importante en el desarrollo de *Acanthamoeba*, ya que aumenta su tasa de crecimiento y su capacidad de colonización, además de asegurar su supervivencia en medios líquidos (Wang & Ahearn, 1997; Cengiz y col., 2000).

1.2.- Clasificación taxonómica

El Comité para la Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos, en 1980 propuso, como resultado de una refusión completa de las claves dicotómicas de los Protozoos, la siguiente clasificación (Martinez & Jantschker, 1985):

Subreino: Protozoa
Phylum: Sarcomastigophora
Subphylum: Sarcodina
Superclase: Rhizopoda
Clase: Lobosea
Subclase: Gymnamoebia
Orden: Amoebida
Suborden: Acanthopodina
Familia: Acanthamoebidae
Género: *Acanthamoeba*

1.2.1.- Clasificación morfológica.

La clasificación taxonómica del género *Acanthamoeba* está en constante revisión. Las especies que en la actualidad conocemos como integrantes de este género, anteriormente se encontraban incluidas dentro del género *Hartmanella*. Fue a partir de 1967, cuando fueron definitivamente clasificadas como género independiente (Page, 1967). Posteriormente, se comenzaron a aplicar diferentes criterios para la clasificación de las distintas especies, basados en el tamaño y forma de sus quistes. En esta clasificación, se incluyeron dieciocho especies diferentes (Pussard & Pons, 1977).

Las especies fueron distribuidas en tres grupos morfológicos distintos. Las del Grupo I, presentan quistes grandes, ectoquiste liso y redondeado, claramente separado del endoquiste, con un aspecto estrellado. Las de los Grupos II y III tienen quistes de menor tamaño, con un diámetro inferior a 18 micras. El ectoquiste de las especies del Grupo II tiene un aspecto arrugado y su endoquiste puede ser estrellado, poligonal, triangular e, incluso, ovalado. Mientras que las especies del Grupo III presentan un ectoquiste liso o ligeramente

arrugado y delgado y su endoquiste puede presentarse redondeado o ligeramente angular, con muy poca separación entre estas dos capas (Pussard & Ponds, 1977).

Grupo I	Grupo II	Grupo III
<i>A. astronixis</i> (Lewis & Sawyer, 1979)	<i>A. castellanii</i> (Douglas, 1930; Volkonski, 1931)	<i>A. palestinensis</i> (Reich, 1933; Page, 1977)
<i>A. comandoni</i> (Pussard, 1964)	<i>A. mauritaniensis</i> (Pussard & Ponds, 1977)	<i>A. culbertsoni</i> (Singh & Das, 1970; Griffin, 1972)
	<i>A. polyphaga</i> (Pushkarew, 1913; Volkonsky, 1931)	<i>A. lenticulata</i> (Molet & Ermolieff-Braun, 1976)
	<i>A. lugdunensis</i> (Pussard & Ponds, 1977)	<i>A. pustulosa</i> (sinónimo de <i>A. palestinensis</i>)
	<i>A. quina</i> (Pussard & Ponds, 1977)	<i>A. royreba</i> (Wiallert, Stevens & Tyndall, 1978)
	<i>A. rhyodes</i> (Singh, 1952; Griffin, 1972)	
	<i>A. divionensis</i> (Pussard & Ponds, 1977)	
	<i>A. paradivisionensis</i> (Pussard & Ponds, 1977)	
	<i>A. griffini</i> (Sawyer, 1971)	
	<i>A. triangularis</i> (Pussard & Ponds, 1977)	

Tabla 1: Clasificación de especies de *Acanthamoeba* basada en la propuesta por Pussard y Pons, 1977.

1.2.2.- Otras clasificaciones.

La identificación de *Acanthamoeba* a nivel de especie, empleando únicamente criterios morfológicos, puede llegar a ser una tarea algo subjetiva, que llega a desviarse sensiblemente de los resultados obtenidos en estudios taxonómicos empleando isoenzimas u

otros análisis moleculares. Las características morfológicas de los quistes están influenciadas por las condiciones medioambientales. Controlando las condiciones de cultivo y del proceso de enquistamiento, se ha observado que diferentes especies presentan características similares en sus quistes y que, en cultivos monoclonales, aparecen quistes de diversa morfología (Stratford & Griffiths, 1978; Visvesvara, 1991).

Dagett y colaboradores, en 1985, en un estudio cladístico, identificaron 15 zimogramas distintos en la electroforesis de isoenzimas (fenotipos), en el género *Acanthamoeba*. Este autor encontró numerosas inconsistencias entre sus resultados y las identificaciones de los aislados existentes, basados en las características morfológicas de los quistes. Aunque estas diferencias podrían deberse particularmente a problemas en la interpretación de los zimogramas, sugirió que debería plantearse la ausencia de criterios consistentes en los parámetros morfológicos empleados para la clasificación de los aislados.

Se han realizado estudios de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) con ADN genómico, de RFLP de ADN mitocondrial (mtRFLP), de homología de secuencias de los genes del ARN ribosómico 18s (Rns) y análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa de RFLP (PCR-RFLP) del gen de la subunidad pequeña mitocondrial del ARN ribosomal, para dilucidar las relaciones intragenéricas y probar la exactitud del esquema de clasificación morfológica de *Acanthamoeba*, donde se ha demostrado que diversos subgrupos no coinciden con las clasificaciones designadas hasta la fecha. Con estos análisis se ha detectado una enorme variedad, dentro de distintas cepas de especies de *Acanthamoeba*. Estos análisis, no solo mostraron una gran divergencia entre especies relacionadas sino que, también, detectaron coincidencias entre acanthamoebas de grupos diferentes (De Jonckheere, 1983, Daggett y col., 1985; Costas & Griffiths, 1986; Byers, 1986; Byers y col., 1990; Yagita & Endo, 1990; Moura y col., 1992; Stothard y col., 1998; Alves y col., 2000).

1.3.- Presencia de especies de *Acanthamoeba* en el hombre.

Debido a la gran distribución de *Acanthamoeba* en la naturaleza, el contacto humano con estos organismos es frecuente e inevitable.

Las patologías que *Acanthamoeba* puede llegar a causar en el hombre están íntimamente relacionadas con la vía de transmisión y, sobre todo, con el estado inmunológico del paciente. Las infecciones sistémicas y las que afectan al sistema nervioso central se van a producir en pacientes que presentan una inmunodepresión general, mientras que, en el caso de las infecciones corneales, van a estar favorecidas por una inmunosupresión local. (Armstrong, 2000).

1.3.1.- Mecanismo de infección.

Para que *Acanthamoeba* pueda llevar a cabo sus efectos citopáticos sobre su hospedador, requiere una serie de procesos previos, como son la adhesión a las células o superficies epiteliales, la secreción de proteasas, para desorganizar a estos tejidos y, por último, la fagocitosis celular. Se ha observado que la fijación es uno de los pasos cruciales en la patogenicidad de la ameba; las amebas no patógenas presentan unos niveles muy bajos de unión a las células de su hospedador (Khan y col., 2000; Yang y col., 1997). El número de acantópodos que presenta la ameba está muy relacionado con su capacidad de adhesión. Las amebas patógenas presentan más de cien por célula, dificultándose su unión, cuando su número no sobrepasa los veinte. (Khan, 2001). La capacidad del parásito para unirse al epitelio celular será, por tanto, un prerrequisito para el establecimiento de la enfermedad y un factor de virulencia que va a determinar la patogenicidad de las diferentes cepas, existiendo diferencias entre las cepas que se aíslan del medio con las que son aisladas de córneas infectadas (Van Klink y col., 1992).

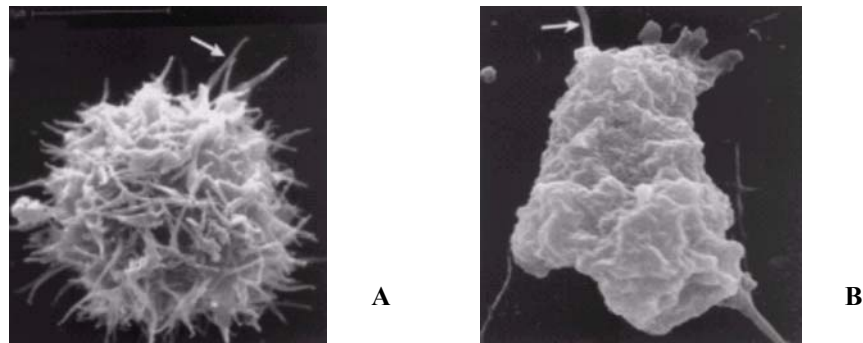


Figura 8: Diferencias morfológicas en función de la capacidad patógena. **A:** *A. castellanii* (cepa patógena); **B:** *A. polyphaga* (cepa no patógena). Obsérvese el elevado número de acantópodos de la *Acanthamoeba* patógena que van a verse involucrados en la adhesión de la ameba (Khan, 2001).

El mecanismo preciso del proceso de adhesión no ha sido aún dilucidado con precisión, pero se sabe que las glicoproteínas y glicolípidos de membrana de la superficie celular facilitan la unión de los trofozoítos de *Acanthamoeba*, como ocurre en el caso de muchas bacterias, hongos y otros protozoos patógenos (Panjwani y col., 1992). La unión a las superficies epiteliales se produce a través de proteínas de unión a la manosa que se presentan en la membrana superficial de la ameba (Yang y col., 1997). Se ha demostrado, *in vitro*, que, si se aumenta la concentración de manosa en células del epitelio corneal, se produce la lisis de las mismas, debido a que, de esta forma, se induce a los trofozoítos a liberar factores citolíticos, principalmente colagenolíticos y serinproteásicos. Mientras que, si se emplean otros tipos de azúcares, como la lactosa, este efecto no se produce (Leher y col., 1998). Las enzimas proteolíticas tienen una gran importancia en el desarrollo de la patogenicidad de *Acanthamoeba* y, de ellas, las que tienen mayor relevancia, están asociadas con las fosfolipasas y las neuraminidasas, siendo las cepas virulentas las que producen mayores cantidades de esta última enzima (Pellegrin y col., 1991).

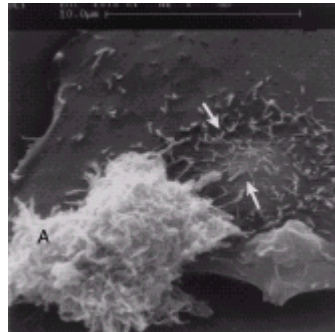


Figura 9: Interacción de una *Acanthamoeba* patógena con células epiteliales de córnea. A: ameba (Khan, 2001)

Existen diferentes teorías sobre los procesos de invasión que pueden llevar a cabo los trofozoítos. El mecanismo denominado como trogocitosis o *picemeal nibbling* que traducido literalmente, viene a describir el proceso de comer a bocados pequeñas partes de la célula diana, a través de los fagostomas o copas alimenticias, en cuyo proceso van a intervenir distintas enzimas hidrolíticas (Marciano-Cabral & John, 1986; Moore y col., 1991); mediante el proceso de lisis celular, donde no va a tener lugar la trogocitosis (Taylor y col., 1995); y mediante sistemas combinados en que podemos observar, conjuntamente, citolisis con la digestión de células enteras. Probablemente, *Acanthamoeba* sea capaz de adaptar su método de colonización en función de la superficie celular a la que se una (Leher y col., 1998).

En la citolisis están implicados elementos del citoesqueleto amebiano, relacionados con la movilidad y con la fagocitosis, y su desorganización va a interferir en los mecanismos líticos. Esto se puede observar al tratar a los trofozoítos con ciertos inhibidores del citoesqueleto, como es el caso de la citochalasina D. En condiciones normales, en un cultivo celular, los trofozoítos de *Acanthamoeba* pueden lisar, tras una hora de incubación, a un ochenta y un por ciento de las células diana, mientras que en presencia de citochalasina D, la

citólisis decae a un cincuenta y cuatro por ciento de las células. Si la incubación con este inhibidor se prolonga durante tres horas, la lisis sólo va a afectar a un diecisiete por ciento de las células del cultivo (Taylor y col., 1995).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* pueden matar a una gran variedad de células de mamíferos, tanto normales como tumorales, empleando mecanismos de citólisis y apoptosis. El mecanismo citolítico que emplea *Acanthamoeba* se asemeja al de las células agresoras naturales, los Linfocitos T Citotóxicos, así como al de otras amebas patógenas, como podría ser el caso de *Naegleria* y *Entamoeba* (Young y col., 1982). Provocan la formación de poros en la membrana de la célula, alterando la presión osmótica de la misma, induciendo su desorganización iónica y, con ello, la muerte (Berke, 1991; Krahenbuhl & Tschopp, 1991). La citólisis o muerte celular es calcio-dependiente, favoreciéndose, cuando se activan sus canales, e inhibiéndose, cuando éstos se bloquean (Taylor y col., 1995).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* son también capaces de inducir apoptosis. Células normales o tumorales de mamíferos, expuestas a trofozoítos o a extractos acuosos de éstos, muertos, presentan aspectos morfológicos característicos del estado de apoptosis, como flacidez celular, desorganización de la membrana, formación de cuerpos apoptóticos, condensación nuclear y presencia de ADN fragmentado, en trozos de 180 a 200 pares de bases, agrupados en multímeros (Alizadeh y col., 1994). Los trofozoítos de *A. culbertsoni* son capaces de inducir apoptosis en las células microgliales, lo que podría tener importancia para el esclarecimiento de la interacción de acanthamoebas patógenas con células nerviosas, en el desarrollo de la Encefalitis Granulomatosa Amebiana (Shin y col., 2000). Estudios *in vitro* demuestran que los trofozoítos presentan respuestas quimiotácticas potentes en extractos de células neuronales y células originarias de la cresta neural (Pidherney y col., 1993) provocando la citólisis directa o apoptosis de células nerviosas (Pettit y col., 1996).

1.3.2.- Respuesta inmune.

Más del 50% de la población presenta anticuerpos frente a *Acanthamoeba*, lo que indica que es un agente bastante común en nuestro medio y con el que estamos en constante contacto (Cursons y col., 1980; Cerva, 1989, Niederkorn y col., 1999).

Los mecanismos de defensa que va a emplear nuestro organismo van a estar relacionados con los procesos de citólisis y acción celular, tanto de macrófagos, como de neutrófilos, mediados ambos por el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y el Interferón gamma (IFN- γ) y favorecidos por la presencia de anticuerpos específicos (Berke y col. 1991, Van Klink y col., 1996; Abbany y col., 2000).

El papel exacto de los neutrófilos, durante el desarrollo de la respuesta inmune, se desconoce. Pero se han encontrado, en un número elevado, en úlceras cutáneas y en córneas de pacientes con queratitis. Su actividad se ve influenciada por la presencia del TNF- α (Ferrante, 1991-b). Está demostrado que juegan un papel importante en la erradicación de *Acanthamoeba* en las infecciones corneales, ya que la disminución de neutrófilos en la córnea, en animales de experimentación, da lugar a una aparición más temprana de la patología y una infección mucho más severa, mientras que su aumento provoca una rápida mejora (Hurt y col., 2001).

Los macrófagos desempeñan una función importante en la primera línea de defensa en la eliminación de los trofozoítos. Se observa que la desaparición de los macrófagos conjuntivales aumenta la incidencia de la infección, agrava la enfermedad, determina que se acelere el comienzo de la queratitis y que ésta tenga un curso más prolongado (Stewart y col., 1992).

Experimentos *in vitro* muestran que los anticuerpos específicos son capaces de activar el mecanismo lítico del complemento, aunque se ha observado que el mecanismo de la cascada del complemento se puede activar frente a los trofozoítos de *Acanthamoeba* incluso cuando estos anticuerpos no se encuentran presentes. Esto es posible, debido a la

presencia de proteínas reguladoras del complemento, como la CD55, en la composición de la lágrima y el epitelio corneal, que activan al complemento de forma local y, así, se protege de los trofozoitos de *Acanthamoeba*, mediante su acción lítica (Ferrante & Rowan-Kelly, 1983; Toney & Marciano-Cabral, 1998).

En modelos experimentales animales, tras la infección corneal, no se ha conseguido detectar niveles de IgG sérica, ni ningún tipo de reacción de hipersensibilidad retardada. La inmunización sistémica por inyección intramuscular sí provoca este tipo de respuesta, pero ésta no previene el desarrollo de la queratitis por *Acanthamoeba* (Alizadeh y col., 1995). Se han empleado mecanismos de inmunización en que se combina la inyección subconjuntival con la intramuscular del parásito. De esta forma, sí se ha logrado generar inmunización. Si sólo existe infección corneal, no se consigue una inmunización total (Alizadeh y col., 1995). Si la inmunización se produce a través de las mucosas, como puede ser el caso de la mucosa ocular, vamos a poder detectar la presencia de anticuerpos anti-*Acanthamoeba* específicos del tipo IgA en la lágrima, que sí van a ser efectivos frente a la infección corneal (Nieder Korn, 2002).

1.4.- Infecciones causadas por *Acanthamoeba*.

Debido al incremento del número de pacientes que requieren una terapia inmunosupresiva, como consecuencia de transplantes de órganos, al aumento de pacientes que han desarrollado SIDA, y a la aparición de queratitis oculares, principalmente en usuarios de lentes de contacto, *Acanthamoeba* se ha convertido en una de las infecciones oportunistas que es importante poder reconocer y diagnosticar (Casper y col., 1999; Oliva y col., 1999).

1.4.1.- Infecciones diseminadas.

Las infecciones diseminadas producidas por *Acanthamoeba* se caracterizan por la aparición de infiltrados granulomatosos en la piel y en el cerebro, normalmente en pacientes inmunocomprometidos o pacientes mermados de salud que, progresivamente, van acercándose a la muerte. Este tipo de patología no tiene, por el momento, una terapia muy efectiva (Oliva y col., 1999). Normalmente, los tratamientos de elección están basados en la inyección intravenosa de pentamidina. Los datos que se tienen en pacientes SIDA indican que este medicamento puede penetrar en el SNC, aunque en muy bajas concentraciones y después de terapias prolongadas, de un mes o más, ofreciendo buenos resultados, siempre que la infección no haya alcanzado el SNC (Donnelly, 1988; Tomlinson, 1991).

Para este tipo de infecciones, hay estudios *in vitro* que documentan la sensibilidad de *Acanthamoeba* hacia agentes antibacterianos, antifúngicos y antiprotozoarios, entre los que se puede incluir la clorhexidina, sulfadiazina, ketoconazol, flucitosina, itraconazol y la anfotericina. Con todos ellos, se recomienda un uso racional y una terapia tópica (Cleland y col., 1982; Friedland y col., 1992; Tan y col., 1993; Slater y col., 1994; Murakawa y col., 1995; Selby y col., 1998).

1.4.2.- Úlceras Cutáneas.

El primer caso de amebiasis cutánea data de 1872 en Méjico (Galarza y col., 1995), siendo citados, hasta 1994, tan sólo siete casos de infección cutánea por *Acanthamoeba*. (Park y col., 1994). Las úlceras cutáneas producidas por *Acanthamoeba*, generalmente, están asociadas a individuos inmunodeprimidos, más concretamente, a pacientes SIDA (Murakawa y col., 1995; Hunt y col., 1995; Delmol, 1996).

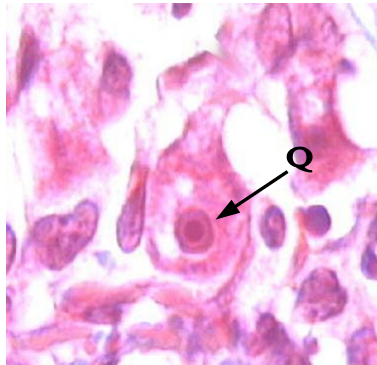


Figura 10: Biopsia de úlcera cutánea. Q: quiste de *Acanthamoeba*.

Las lesiones cutáneas suelen presentarse de dos formas. Como una inflamación supurativa de la subepidermis, con epidermis intacta que, al cabo de los meses, se transforma en una úlcera violácea, con la base endurecida y extendida (Figura 11). O bien como una forma nodular, dura y bien delimitada, que se extiende progresivamente en superficie y profundidad (Figura 12). En ambos casos la evolución es lenta, de uno a tres años, pudiendo llegar a producirse metástasis superficiales. (Hunt y col., 1995).



Figura 11: Lesión cutánea con inflamación supurativa de la subepidermis

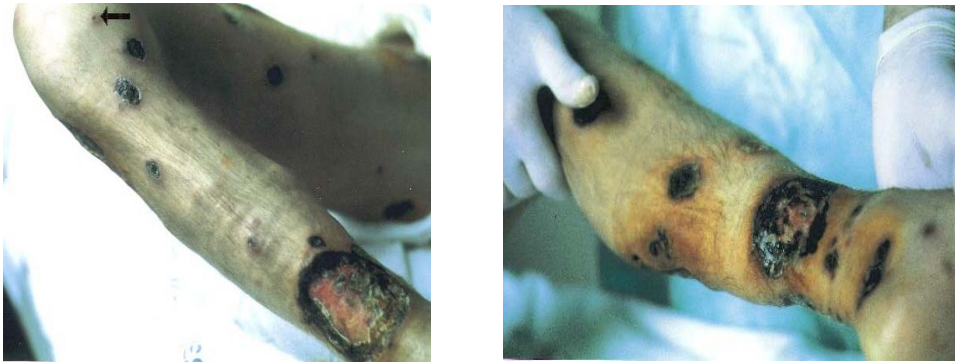


Figura 12: Lesión cutánea nodular, dura y bien delimitada, que se extiende progresivamente en superficie y profundidad.

Las causas por las que se pueden desarrollar estas úlceras incluyen lesiones debidas a infecciones virales en la piel, mordeduras, traumas y tejidos en cicatrización (Sison y col., 1995). En pacientes SIDA, afecta con mayor frecuencia el parénquima testicular y a los vasos sanguíneos (Khalife y col., 1994).

En su tratamiento, el uso combinado de forma tópica de clorhexidina, sulfadiazina, ketoconazol, flucitosina, itraconazol y anfotericina suele ser satisfactorio (Figura 13) (Cleland y col., 1982; Friedland y col., 1992; Tan y col., 1993; Slater y col., 1994; Murakawa y col., 1995; Selby y col., 1998).

Hay que tener en cuenta a *Acanthamoeba* como agente etiológico, en los diagnósticos diferenciales de determinadas úlceras cutáneas, con o sin afectación del SNC, cuando no se detecta contaminación bacteriana, fúngica o por micobacterias en las biopsias y cultivos. El diagnóstico debe realizarse con prontitud, particularmente antes de que la infección penetre en el SNC, donde puede causar la muerte del paciente (Seijo-Martinez y col., 2000).

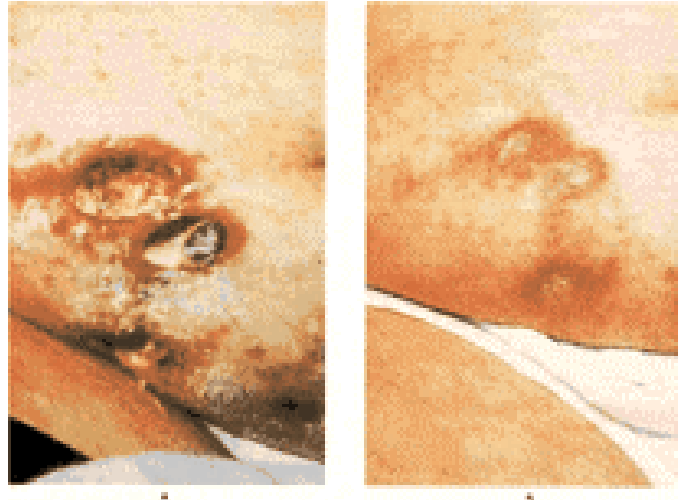


Figura 13: Lesión cutánea antes y después de tratamiento.

1.4.3.- Encefalitis Granulomatosa Amebiana.

Los primeros casos de meningoencefalitis amebianas comenzaron a diagnosticarse en 1948. En un principio, al agente causal se le relacionaba, en unos pocos casos, con unos protozoos cercanos a las especies de *Iodameba*, pero que no eran idénticos; y, en otros muchos, con amebas pertenecientes al género *Hartmanella*, donde se encontraban incluidas las especies de *Acanthamoeba*. No fue hasta principios de los ochenta, después de aislar *post mortem* especies *Acanthamoeba* de cerebros de pacientes que habían sufrido una lenta y progresiva encefalitis, cuando se asoció directamente a esta ameba como su agente causal (Martinez, 1980).

Hasta el año 1989, se habían descrito doscientos casos de meningoencefalitis amebiana, de los cuáles, cincuenta y seis fueron debidos a *Acanthamoeba* (Visvesvara, 1990), pero la incidencia actual es desconocida.

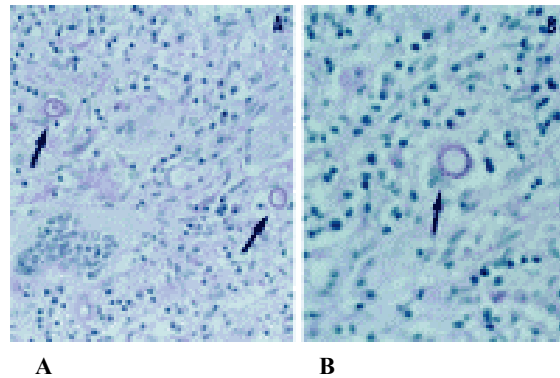


Figura 14: examen histopatológico de tejido cerebral donde se puede observar la presencia de quistes de *Acanthamoeba*. A: x200; B: x400 (Seijo-Martinez y col. 2000).

La Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) es una infección oportunista y poco frecuente del Sistema Nervioso Central (SNC), de evolución lenta, de difícil diagnóstico y sin tratamiento eficaz. Normalmente afecta a individuos con su sistema inmunitario comprometido, ya sea, por tratamientos con esteroides, quimioterapia y radioterapia, o por alcoholismo, enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus o pacientes con alteraciones hematológicas o con SIDA (John, 1998).

El cuadro clínico es de evolución subaguda y crónica. Tiene un periodo de incubación de unas dos semanas, en que van a aparecer afectados los hemisferios cerebrales, siendo las áreas más dañadas el diencéfalo, el tálamo y el bulbo raquídeo, con un deterioro neurológico progresivo, un intenso edema, ablandamiento del tejido, necrosis y abscesos, con presencia de trofozoítos y quistes. En algunos casos, la encefalitis se presenta como si fuera un tumor cerebral, llegando a ocupar un espacio bien definido. Puede aparecer conjuntamente sinusitis crónica, irritación meníngea, alteraciones del estado mental, cambios

de personalidad, irritabilidad, confusión mental, mareos, somnolencia, cefaleas, convulsiones y hemiparesia. Finalmente, el paciente entra en coma y, después, sobreviene la muerte. (Pearl, 1990; Sangruchi y col., 1994; Murakawa y col., 1995).

La EGA se inicia fundamentalmente por vía hematológica, a partir de focos primarios localizados en el tracto respiratorio inferior, o de lesiones ulcerosas o nodulares en la piel, siendo ésta la primera puerta de entrada, en la mayoría de los casos. Existen sospechas de que el tracto gastrointestinal puede jugar también un papel importante (Mandell, 1990; Bottone, 1993). Además, se han descrito aislamientos de trofozoítos en pacientes con otitis media crónica supurativa, en pacientes con queratitis crónicas, con afectación de la mucosa nasal, en cultivos nasofaríngeos y en el tejido neuroepitelial olfatorio de animales de experimentación. (Sadaka & Emam, 2001).

El diagnóstico se hace por sospecha, según los antecedentes epidemiológicos, los datos clínicos, y la visualización de los protozoos en el líquido cefalorraquídeo. Normalmente, el agente es identificado en cortes cerebrales *post mortem*. Aunque nunca se han aislado estos protozoos del fluido cerebroespinal, existen signos que delatan su presencia, como son el aumento de las proteínas presentes en el líquido cefalorraquídeo, disminución de los niveles de glucosa y un aumento del número de células blancas, principalmente linfocitos (Marciano-Cabral y col., 1995).

Por el momento, no existen tratamientos efectivos y, normalmente, los pacientes inmunodeprimidos afectados fallecen. Dentro de los factores que contribuyen a esta pobre respuesta del tratamiento se encuentra el retraso en el diagnóstico, ya que este tipo de infecciones son raras y, en sus inicios, presentan muy pocos síntomas claros que ayuden a su identificación. Los fármacos antiparasitarios presentan unos niveles muy bajos de penetración en el líquido cefalorraquídeo, además se enfrentan a la capacidad que *Acanthamoeba* tiene para formar quistes y a su resistencia a cualquier tipo de agente externo (Bottone, 1993; Khunkitti y col., 1998). Se han descrito resultados esperanzadores frente a este tipo de infecciones, con fármacos, como son la sulfadiazina, el fluconazol, la

pentamidina y el itraconazol (Cleland y col., 1982; Friedland y col., 1992; Tan y col., 1993; Slater y col., 1994; Murakawa y col., 1995; Selby y col., 1998).

Las especies que han sido aisladas relacionadas con casos de EGA son *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes* y *A. palestinensis* (Armstrong, 2000).

1.4.4.- Queratitis por *Acanthamoeba*

La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección invasiva de la córnea, que se caracteriza por una pérdida gradual de agudeza visual, llegando, en algunos casos, a provocar ceguera. En este caso, las afecciones corneales no están asociadas a individuos inmunodeprimidos, sino, principalmente, a usuarios de lentes de contacto (Radford y col., 1998).

La primera descripción de queratitis por *Acanthamoeba* data de 1973 (Nagington y col., 1973) y, en los primeros casos, se las relacionaba con traumatismos oculares menores, sin encontrar un elevado número de individuos afectados. A principios de los años ochenta comenzó, a aumentar, de forma gradual, el número de diagnósticos, siendo el primer caso descrito en un portador de lentes de contacto en 1984: “se trataba de un paciente que usó lentes de contacto blandas mientras estaba en una bañera de agua caliente de la que se aisló *Acanthamoeba*” (Samples y col., 1984). A partir de este hecho, se registró un mayor número de diagnósticos. Un año más tarde, en 1985, se estableció su asociación directa con el uso de lentes de contacto (Stehr-Green y col., 1989). Desde entonces hasta ahora, se han contabilizado cientos de casos de queratitis por *Acanthamoeba* (Moore, 1988).

No todas las queratitis por *Acanthamoeba* tienen lugar en usuarios de lentes de contacto. Entre el diez y el quince por ciento de los diagnósticos se realizan en pacientes que no las emplean. Normalmente, suelen estar asociados a una lesión ocular, normalmente con alguna materia vegetal o exposición a agua o tierra contaminada. A menudo, están

relacionados con ambientes rurales o tras haber sufrido una lesión ocular, mientras practicaban actividades acuáticas o relacionadas con la nieve (Sharma, y col., 1990; Chang & Soong, 1991). Por lo general, el estado visual de estos pacientes es marcadamente peor que el de los usuarios de lentes de contacto debido, fundamentalmente, al retraso en el diagnóstico, pues no se suele incluir esta posibilidad de infección en pacientes que no emplean estas lentes (Radford y col., 1998). La queratitis por *Acanthamoeba* también puede aparecer tras una queratoplastia invasiva o radial (Preston & King; 1984; Parrish y col., 1991; Panda y col., 1999).

Se han descrito casos de queratitis por *Acanthamoeba* con todo tipo de lentes de contacto, pero aparecen con más frecuencia cuando se emplean lentes desechables de periodicidad mensual o bimensual. En un estudio llevado a cabo, se demostró que esta asociación no es consecuencia de un problema intrínseco de este tipo de lente, sino, sobre todo, del resultado de su forma de uso. Estas lentes, normalmente, no requieren de protocolos de desinfección, simplemente de mantenimiento y, para, ello se emplean diferentes soluciones, recomendadas por el fabricante que, en muchos casos su efectividad frente a trofozoítos y sobretodo a quistes de *Acanthamoeba* es bastante discutida (Kilvington, 1993; Kilvington, 1999). Por el contrario, las lentes de contacto de mayor duración sí incluyen métodos de desinfección que, por lo general, son más efectivos frente a las diferentes formas de *Acanthamoeba* (Seal y col., 1992; Radford y col., 1995;). Lo que sí está claro es que la contaminación es particularmente común si los usuarios no emplean ningún método de desinfección, o no lo hacen con la frecuencia adecuada. La colonización bacteriana de los estuches de lentes va a facilitar el desarrollo de las amebas en su interior (Larkin y col., 1990).

La eficacia de diferentes desinfectantes empleados en las lentes de contacto ha sido estudiada en detalle en distintos estudios. Soluciones desinfectantes que contienen clorhexidina al 0'004 y 0'005 % son efectivas para la eliminación de trofozoítos, después de

un tiempo de exposición que oscila entre una y cuatro horas (Silvany y col., 1991 y 1992), pero sin ningún efecto quisticida (Brandt y col., 1989; Connor y col., 1989). Mientras que el empleo de peróxido de hidrógeno al 3 %, durante un periodo de seis a veinticuatro horas, sí es efectivo para la eliminación de quistes (Brant y col., 1989). Por el contrario, si el peróxido de hidrógeno es utilizado en los estuches portales, empleando el sistema de discos con catalizador, no actúa con tanta eficacia (Lindquist y col., 1988; Silvany y col., 1990). La biguanida de poliaminopropilo al 0'0015 % presenta actividad trofozoítica y quisticida, después de cuatro horas de exposición (Silvany y col., 1991). Los sistemas de desinfección por calor han presentado buenos resultados, pero hay que tener en cuenta que no está recomendado en todos los tipos de lentes (Ludwig y col., 1986; Lindquist y col., 1988). A pesar de todo esto, se han diagnosticado casos de queratitis por *Acanthamoeba*, tanto en usuarios de lentes de contacto que no cumplían con las recomendaciones de desinfección, considerados como población de riesgo, como en usuarios que empleaban sistemas de desinfección teóricamente efectivos (Leher y col., 1998)

Aunque el uso de lentes de contacto es el factor de riesgo más importante en las queratitis por *Acanthamoeba*, la incidencia de ésta entre sus portadores es muy baja. El hecho de que se haya cultivado *Acanthamoeba*, a partir de las lentes o de sus recipientes, en más de un veinte por ciento de usuarios de lentes de contacto asintomáticos, indica que el microorganismo es relativamente poco virulento, que existe inmunidad innata en el huésped o que el epitelio corneal ofrece una barrera efectiva frente a la penetración de las amebas en el estroma (Yu y col., 2001).

Diferentes estudios demuestran la facilidad con la que quistes y trofozoítos *Acanthamoeba* se adhieren a la superficie de las lentes de contacto, independientemente del tipo que se trate (John y col., 1989; Farley, 1998). Los trofozoítos presentan mayor grado de adherencia que los quistes y ésta aumenta en función del tiempo de exposición (Kelly & Xu, 1995). Se ha observado que, en tiempos mínimos, alrededor de 10 segundos, se puede producir la colonización de la lente (Kelly y col., 1995). No todos los materiales con los que

se elaboran las lentes de contacto: Lidoficon[®], Etafilcon[®], Polymacon[®], y Bufilcon[®], muestran el mismo grado de susceptibilidad a la colonización. El grado de hidratación de la lente y su composición iónica van a influir en la adherencia (Seal y col., 1995). El material que presenta mayor predisposición es el Lidofilcon[®], y el que menor, el Etafilcon[®]. Las posibilidades de colonización de los trofozoítos aumenta normalmente, en función de la concentración del inóculo, aunque esta relación no es directamente proporcional. En todos los casos, la concentración mínima efectiva necesaria en la que se observaba adherencia era de 1×10^2 protozoos (Sharma y col., 1995).

1.4.4.a.- Características clínicas

La queratitis por *Acanthamoeba* se desarrolla en individuos sanos e inmunológicamente competentes, afectando con mayor frecuencia a varones. Los síntomas son muy variados. La mayoría de los pacientes presenta fotofobia, dolor intenso, desproporcionado con los signos que se presentan, y alguna pequeña úlcera. Rara vez suele presentarse inmediatamente, tras un hecho traumático para el ojo o utilizar unas lentes contaminadas (Bacon y col., 1993-a).

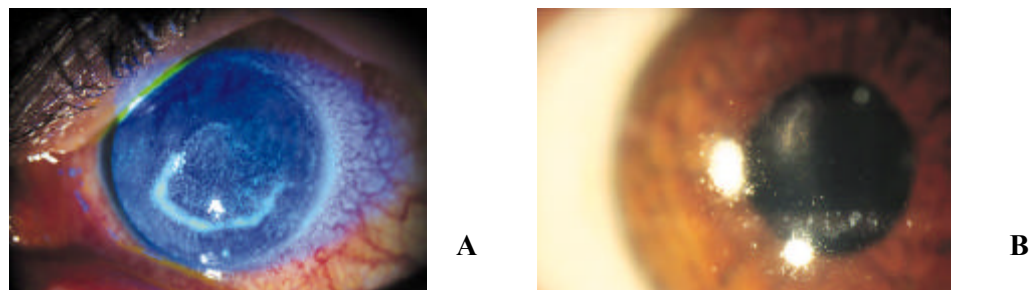


Figura 15: **A)** Queratopatía punteada con pseudodentritas (Fulcher & Dart, 1998). **B)** Infiltrados epiteliales de *Acanthamoeba* (Fulcher & Dart, 1998).

Los signos clínicos más frecuentes que presenta esta patología no son muy específicos. Incluyen: queratopatía punteada, pseudodendritas (Figura 15-A), infiltrados epiteliales (Figura 15-B), infiltrados subepiteliales difusos o focales y perineurales, que se presentan en las fases iniciales. A medida que el estroma corneal se llena de líquido, se va formando un característico anillo de infiltración (Figura 16).

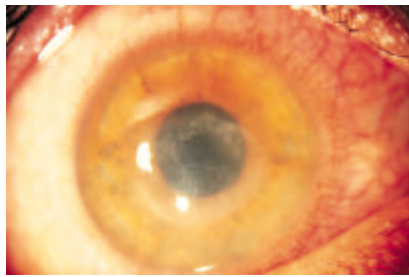


Figura 16: Anillo de infiltración característico que se forma en la queratitis por *Acanthamoeba* (Fulcher & Dart, 1998).

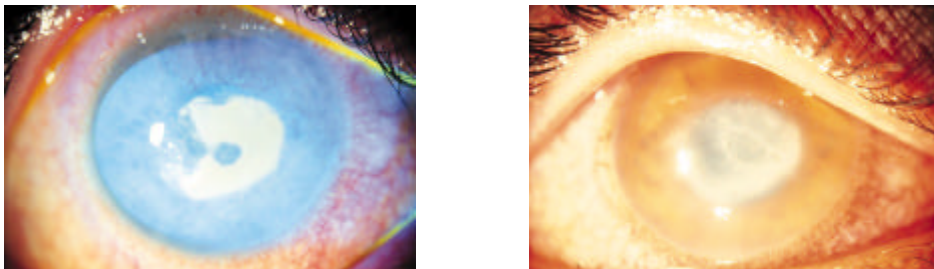


Figura 17: Proceso de cronificación en el centro de la córnea (Fulcher & Dart, 1998).

Aparecen abscesos, escleritis, glaucoma, cataratas e infecciones microbianas secundarias, aunque la limbitis y la escleritis anterior son signos clínicos que se asocian con mayor frecuencia a la queratitis por *Acanthamoeba* (Dougherty y col., 1994; Hirano & Sai, 1999). El proceso tiende a cronificarse en el centro de la córnea (Figura 17) y, en estadios

avanzados, se caracteriza por la pérdida del epitelio corneal, con una marcada opacidad del estroma (Bacon y col., 1993-b; Illingworth, y col., 1995). La movilidad de las especies de *Acanthamoeba* y su capacidad de elaborar gran cantidad de proteasas podrían incrementar su invasión tisular, pero, aún así, casi nunca penetran en el endotelio corneal y logran alcanzar el interior del ojo. Presentan una gran respuesta quimiotáctica hacia las células neuronales y los nervios corneales (Pidherney y col., 1993), dando lugar a una neuritis radial, lo que podría explicar el dolor inusual que es característico de la queratitis por *Acanthamoeba* (Nieder Korn y col., 1999).

Se han descrito quistes no viables en el interior de córneas transplantadas, que pueden sugerir sus paredes pueden seguir siendo antigénicas y causar una escleritis persistente, mediada por el sistema inmunitario (Holland y col., 1991).

Si el diagnóstico de la queratitis es correcto, se hace pronto y se aplica el tratamiento correcto, el pronóstico es bueno. Son frecuentes los diagnósticos erróneos, tales como queratitis por herpes simple o por hongos. El mejor conocimiento de esta patología por parte de los especialistas, ha permitido disminuir el número de confusiones en los diagnósticos. En el Reino Unido, el descenso fue espectacular: descendió del setenta por ciento de error, entre 1984 y 1990, al once por ciento, en 1992 (Bacon y col., 1993-b).

1.4.4.b.- Tratamiento.

Agentes amebicidas:

En los primeros años de la aparición de las queratitis por *Acanthamoeba*, los tratamientos amebicidas utilizados no eran satisfactorios. Se empleaban una gran variedad de agentes tópicos, solos o combinados, con muy poco éxito, terminando el paciente con la pérdida gradual de la visión o con la enucleación del ojo infectado. En 1985, se empieza a utilizar, de forma combinada, una diamidina aromática, el isotianato de propamidina al 0'1

%, junto con dibromopropamidina al 0'15 %, de forma tópica, seguido con el tratamiento con neomicina, con buenos resultados si se aplicaban desde el comienzo de la afección (Wright y col. 1985; Moore & McCulley, 1989). En algunos pacientes, este tratamiento era ineficaz y era necesario combinar la propamidina con miconazol al 1 % (Berger y col., 1990; Cohen y col., 1987; Lindquist y col., 1988), o bien con itraconazol vía oral junto con miconazol 0'1 % o ketoconazol vía tópica (Ishibashi y col., 1990; Amoils y col, 1999).

A comienzos de los noventa, se comprobó la actividad in vitro que presentaba el desinfectante catiónico polihexametilenbiguanida (PHMB) para eliminar, tanto trofozoítos, como quistes de *Acanthamoeba*, de un gran número de cepas (Larking y col., 1992; Elder y col., 1994). Su actividad, a bajas concentraciones (0'02 %) y no presentar problemas de toxicidad, al contrario de lo que ocurría con otros tratamientos (Berry y col., 1993), hizo del PHMB, solo o combinado con propamidina, aplicado en los estadios iniciales de la infección, una terapia con buenos resultados que evitaba, en muchos casos, tener que recurrir a la cirugía (Illingworth, y col., 1995).

Corticoesteroides:

Su uso es controvertido, ya que pueden llegar a suprimir la respuesta inmune del paciente (D'Aversa y col., 1995). Los corticoesteroides van a inhibir los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, su empleo en la fase inicial de la infección, permite la eliminación de los trofozoítos con mayor facilidad, tanto farmacológicamente, como por la respuesta inmune del paciente. Al inhibir el proceso de desenquistamiento, los agentes antiamebianos que son menos efectivos frente a este estadio, pueden llegar a presentar problemas de resistencia. Por lo general, no se suelen emplear en los estadios iniciales, donde la respuesta a los antiamebianos es rápida. Se emplea en ocasiones, y en dosis bajas, cuando se presenta una inflamación persistente (Ficker y col., 1993; Stern & Buttoross, 1991)

Agentes antibacterianos:

Inicialmente, su uso era indicado para potenciar la actividad de los antiamebianos, pero esto ha dejado de tener importancia, debido a la introducción en el mercado de componentes antiamebianos con mayor actividad, que evitan infecciones corneales bacterianas simultáneas o secundarias. Normalmente, están indicados como medida profiláctica, de forma tópica (Illingworth, y col., 1995; Seal y col., 1996).

Extirpación de la zona afectada:

Se han llevado a cabo pequeñas intervenciones quirúrgicas en que se extirpa la zona del epitelio corneal afectado, en los primeros estadios de la infección, con buenos resultados y sin que se presenten problemas de posteriores recaídas. Esta práctica no está muy extendida (Brooks y col., 1994).

Queratoplastia:

Cuando la infección se encuentra en un estado muy avanzado, se hace necesario el trasplante de córnea. Con la mejora de los tratamientos farmacológicos, estas intervenciones están cada vez más en desuso. Se aconseja el trasplante, si en la fase aguda de la infección la córnea se vuelve muy fina y existe riesgo de perforación y para sustituir córneas que han quedado afectadas y limitan la visión. Con el trasplante, no se asegura la erradicación de la infección pues, con este tratamiento, puede que no se eliminen todos los trofozoítos o quistes y éstos pueden colonizar la nueva córnea. Se aconseja el tratamiento del ojo afectado con PHMB, antes y después de la intervención. (Blackman y col, 1984; Cohen y col., 1987; Ficker y col., 1993).

1.5.- Profilaxis.

La amplia distribución de las amebas de vida libre hace que sea extremadamente difícil establecer unas medidas de control adecuadas. El hombre se encuentra frecuentemente expuesto a ellas. La mayoría de los casos de infección descritos están relacionados con la presencia de estas amebas en el agua, por lo que, fundamentalmente, las medidas profilácticas deben tomarse con este medio.

Las medidas a aplicar son bastante complicadas, debido a la abundancia de estos protozoos y, evidentemente, evitar su multiplicación en la naturaleza es complicado. Los procesos de desinfección que se emplean, habitualmente, en las aguas de consumo no son eficaces para la eliminación de *Acanthamoeba*. Ni la cloración, método empleado habitualmente, ni procesos de alta tecnología, como son la ósmosis inversa o la ozonización, aseguran su erradicación. Se aconseja, en este sentido disminuir la cantidad de materia orgánica y mantener una adecuada corriente de agua, con una buena cloración, recomendando no utilizar de filtros de arena o bien su renovación frecuente. Las medidas a tomar son bastante complicadas debido a la abundancia de estos protozoos.

En el caso de las infecciones que causan en humanos, los individuos inmunocomprometidos son un grupo de riesgo con el que se deben extremar las precauciones y no descartar nunca la posibilidad de que puedan padecer alguna de las patologías descritas. En las afecciones corneales los usuarios de lentes de contacto, deben cuidar las medidas higiénicas en el uso y conservación de sus lentes (Rosenberg & Morgan, 2001).

1.6.- Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD).

La Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) fue propuesta inicialmente por Welsh y McClelland, en 1990, y Williams y col., en 1991. Es una

técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pero en la que se introducen ciertas modificaciones a la técnica convencional.

Los fragmentos generados por la amplificación del ADN al azar, se obtienen con un único cebador de secuencia arbitraria. Es un método simple, que no necesita el conocimiento previo de secuencias de ADN que nos permite analizar gran variedad de loci simultáneamente, donde los polimorfismos existentes entre las cepas o especies analizadas son detectados, mediante una electroforesis, como diferencias entre los patrones de fragmentos de ADN amplificados (Welhs & McClelland, 1990; Williams y col., 1990; Steindel y col., 1994).

El oligonucleótido es mezclado con ADN genómico, en presencia de una ADN polimerasa y un tampón adecuado. Los productos resultantes de la amplificación van a depender de muchos factores como, por ejemplo, la longitud y secuencia del cebador, las condiciones de reacción, el termociclador empleado, etc. Todos estos parámetros han de ser estrictamente controlados para obtener resultados reproducibles.

La concentración de ADN es una de las variables más importantes. Las extracciones de ADN producen muestras de diferente pureza, lo que hace que haya que optimizar la cantidad de ADN cada vez que se realice una amplificación. Una cantidad elevada da como resultado extensiones de ADN sin bandas definidas y, una con una cantidad escasa, se observan patrones irreproducibles (Williams y col., 1993).

Las cantidades de ión magnesio y la temperatura de anillamiento afectan a la intensidad de las bandas amplificadas. Si se aumenta la temperatura de anillamiento los perfiles tienden a simplificarse, debido a que se aumenta la especificidad del sitio de unión del cebador, desapareciendo las bandas de baja intensidad (Caetano-Anolles & Bassam, 1993). Además los patrones de amplificación son diferentes, cuando se utilizan diferentes ADN polimerasas (Schierwater & Ender, 1993).

Con respecto al cebador, una elevada concentración produce extensiones de ADN que impiden una clara detección de las bandas de amplificación. Y una baja concentración

hace que sea difícil su detección, como ocurre también con una baja concentración de nucleótidos trifosfato (Munthali y col., 1992; Williams y col., 1993). Su longitud y secuencia son también factores muy importantes. Estudios realizados en *Escherichia coli* con un cebador de diez nucleótidos, al que se le va eliminando uno, hasta cinco, tras sucesivos experimentos, muestra que los patrones de amplificación son diferentes en complejidad y distribución de bandas, según el cebador tenga cinco, seis, siete y ocho nucleótidos. Al aumentar el número de bases, se disminuye el número de productos amplificados. Los cebadores de ocho y diez nucleótidos producen patrones idénticos. Por otra parte, cambios en la secuencia de nucleótidos del cebador, producen cambios en el perfil de amplificación.

Poco se sabe acerca de la naturaleza de las secuencias de ADN amplificadas por RAPD; en varias especies de plantas, se ha visto que al menos el 45 % de esas secuencias, están altamente repetidas en el genoma. En teoría, los sitios de amplificación empleados están relacionados con la complejidad del genoma, estando distribuidos a lo largo de éste (Williams y col., 1991; Reiter y col., 1992; Quiros y col., 1995).

El resultado de la amplificación es determinado por la competición entre los diferentes sitios de hibridación en el genoma. Un factor importante es probablemente la estabilidad de híbrido formado entre el cebador y su sitio de unión en el genoma. Si el genoma presenta una alta complejidad, debe tener más sitios con mayor complementariedad con el cebador, que un genoma menos complejo (Williams y col., 1993).

1.6.1.- Mecanismo de amplificación de los RAPD.

Caetano-Anolles y col., en 1992, postularon, que este proceso se modulaba a dos niveles:

1.- La selección de sitios de amplificación es determinada por la secuencia del cebador e influenciada por las condiciones de reacción. Durante los primeros ciclos,

el cebador “busca” los posibles sitios de unión en el ADN y se une a éstos. La unión del cebador es seguida por la actuación de la polimerasa con la consiguiente extensión de las cadenas. Así, en la primera rueda de amplificación, se selecciona un conjunto de posibles sitios para producir una población de productos de amplificación determinada. Estos productos deberían ser entonces eficientemente amplificados desde la secuencia complementaria a la del cebador.

2.- En el segundo nivel de modulación, los productos de amplificación resultantes poseen una región terminal simétrica de, al menos, la longitud del cebador. Estos fragmentos son repetidamente amplificados en cada uno de los ciclos de la PCR.

Según Andresen y col, 1996, la presencia de bandas más intensas en el patrón de amplificación es debida a una mayor similitud entre las secuencias del ADN y la del cebador, o a que estas secuencias estén más repetidas en el genoma.

1.6.2.- Repetitividad del método RAPD.

Según algunos autores, una de las desventajas de la utilización de la técnica de RAPD es la poca repetitividad de los resultados de la amplificación (Beebe y col., 1995). Aunque otros, como Ellsworth y col., 1993, recomienda estandarizar las condiciones de la reacción e introducir controles internos para evitar los problemas de repetitividad de los experimentos. Algunos autores, para mitigar este problema, eliminan las bandas que no amplifican consistentemente (Yang y Quiros, 1993; Novy y col., 1994).

La amplificación mediante RAPD depende de muchos factores y se va a ver influenciada por cambios en la concentración del ión Mg^{++} , la polimerasa termoestable utilizada, la temperatura de anillamiento del cebador e incluso el termociclador empleado, que pueden provocar cambios en los perfiles de amplificación obtenidos. Como se ha

comentado anteriormente, todos estos parámetros tienen que ser controlados estrictamente para obtener resultados reproducibles (Yu & Pauls, 1992; Meunier & Grimot, 1993; Penner y col., 1993; He y col., 1994; Bielawki y col., 1995, Alonso, 1999).

1.6.3.- Aplicaciones de la técnica RAPD.

Dentro de las aplicaciones de la técnica RAPD, se encuentra la realización de mapas genéticos, el diagnóstico molecular, la taxonomía molecular, epidemiología, diferenciación de cepas, etc. (Myers y col., 1993, Williams y col., 1993; Czaija & Batt, 1994; Saulnier y col., 1993).

En lo concerniente a los agentes parasitarios, se ha demostrado que esta técnica es capaz de discriminar entre subgéneros y especies de diferentes protozoos parásitos (Noyes y col., 1996; Alonso, 1999).

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

1. Puesta a punto de una técnica de RAPD para la caracterización de especies del género *Acanthamoeba*.
2. Utilizar los fragmentos característicos de los productos amplificados para el diseño de cebadores específicos.
3. Verificación de la utilidad de esta herramienta para el diagnóstico de estas parasitosis en muestras de origen humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES.

3.1.- Soluciones y tampones.

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0'14 M, KCl 2'68 mM, Na₂HPO₄ 0'01 M, KH₂PO₄ 1'76 mM, pH: 7'4.
- Tampón TAE 50X: Tris-HCl 2 M, pH: 7'2; EDTA 50 mM, pH: 8; Ac. acético 57'1 ml.
- Tampón TBE 10X: Tris-HCl 89 mM, pH: 8'3; ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.
- Tampón de carga para electroforesis de ADN:
 - Geles de agarosa: Azul de bromofenol (BPB) 0'25% (p/v), glicerol 30% (v/v).
 - Geles de acrilamida: Azul de dextrano, formamida desionizada.
- Tampón de lisis TELT: Tris-HCl 50 mM, pH: 8; EDTA 62'5 mM, pH: 9; LiCl 2'5 M; -100 4% (v/v).
- Solución de Tiocianato de Guanidinio: Tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, pH: 7; N-lauroylsarcosina 0'5%, 2-Mercaptoetanol 0'1 M.
- Tampón SSC 20X: NaCl 3 M; citrato sódico 0'3
- Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, pH: 8; EDTA 1 mM.
- Soluciones de hibridación con sondas marcadas con digoxigenina:
 - SSC 5X
 - Solución de bloqueo 1%, SDS 0'02% y N-lauroylsarcosina 0'02%.
 - Tampón 1: Ácido maleico 0'1 M; NaCl 0'15 M; pH: 7'5.
 - Tampón 2: Solución de bloqueo diluida 1:10 en tampón 1.
 - Tampón 3: Tris-HCl 100 mM, pH: 8; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM; pH: 9'5.
 - Solución de substrato cromogénico: NaCl 0'1 M; MgCl₂ 0'05 M; Tris-HCl 0'1 M, pH: 9'5; NBT/BCIP 1:50 (Boehringer Mannheim®).

- Tampón de transferencia de ADN: NaOH 0'4 N.
- Solución de desnaturalización: NaOH 0'5 M; NaCl 1'5 M.
- Solución de neutralización: NaCl 1'5 M; Tris-HCl 0'5 M.
- Tampón de reacción para PCR: KCl 50 mM; MgCl₂ 1'5 mM; Gelatina 0'001 %, Tris-HCl 10 mM, pH: 8'3. (Perkin-Elmer[®])
- Fenol equilibrado con Tris-HCl 0'1 M, pH: 8.
- Mezcla clorofórmica: Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
- IPTG.
- X-Gal.

3.2.- Medios de cultivo.

3.2.1.- Medio de cultivo ATCC 712 PYG.

- Triptona 20'0 g.
- Extracto de levadura..... 1'0 g.
- Agua destilada c.s.p..... 950 ml.
- MgSO₄ · 7 H₂O 0'4 M..... 10'0 ml.
- CaCl₂ 0'5 M..... 20'0 g.
- Citrato sódico · 2 H₂O 0'1 M..... 34'0 ml.
- Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 H₂O 0'005 M 10'0 ml.
- Na₂HPO₄ · 7 H₂O 0'25 M..... 10'0 ml.
- KH₂PO₄ 0'25 M 10'0 ml.
- pH a 6'5. Se autoclava a 121° C, 25 minutos, y se añade 50 ml de glucosa 2 M esterilizada por filtración.

3.2.2.- Medio salino de Neff modificado para amebas.

- NaCl	0'60 g.
- MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0'02 g.
- CaCl ₂ · 2 H ₂ O.....	0'02 g.
- Na ₂ HPO ₄	0'71 g.
- KH ₂ PO ₄	0'68 g.
- Agua destilada c.s.p.....	1000 ml.
- Se ajusta el pH a 6'5, y se autoclava a 121° C, 25 minutos.	

3.2.3.- Solución modificada de Neff y Band (Page, 1967).

- NaCl	0'120 g.
- MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0'004 g.
- CaCl ₂ · 2 H ₂ O.....	0'004 g.
- Na ₂ HPO ₄	0'142 g.
- KH ₂ PO ₄	0'136 g.
- Agua destilada c.s.p.....	1000 ml.
- Se ajusta el pH a 6'5, y se autoclava a 121° C, 25 minutos.	

3.2.4.- Medio AX2 modificado por S.K. Maciver.

- Triptona	14'3 g.
- Extracto de levadura.....	7'15 g.
- Glucosa.....	15'4 g.

- Na₂HPO₄..... 0'51 g.
- K₂HPO₄..... 0'486 g.
- Agua destilada c.s.p..... 1000 ml.
- Se ajusta el pH a 6'5. Se autoclava a 121° C, 25 minutos.

3.2.5.- Medio de crecimiento PPG.

Medio empleado para el mantenimiento de las cepas adquiridas del CCAP.

- Proteosa peptona 15 g.
- Glucosa..... 18 g.
- Solución salina de Neff c.s.p..... 1000 ml.
- Se ajusta el pH a 6'5. Se autoclava a 121° C, 25 minutos.

3.2.6.- Medio de axenificación de *Acanthamoeba*.

- Extracto de malta 3 g.
- Proteosa peptona 14'3 g.
- Extracto de levadura..... 7'15 g.
- Glucosa..... 15'4 g.
- Na₂HPO₄..... 0'51 g.
- K₂HPO₄..... 0'486 g.
- Agua destilada estéril c.s.p. 1000 ml.
- Se ajusta el pH a 6'5. Se autoclava a 121° C, 25 minutos.

3.2.7.- Medio Agar base 2 %.

- Bacto agar..... 2 g.
- Agua destilada estéril c.s.p..... 1000 ml.
- Se ajusta el pH a 6'5. Se autoclava a 121° C, 25 minutos.

3.2.8.- Medios de cultivos bacterianos.

- Medio LB líquido: Triptona 1%; extracto de levadura 0'5%; NaCl 1%.
- Medio LB-agar: medio LB líquido; bacto agar 2% (p/v).

3.3.- Antibióticos.

- Gentamicina (Gervamicin[®]) 80 mg/ml.
- Ampicilina (Roche[®]) 100 µg/ml.

3.4.- Antifúngicos.

- 5 Fluorocitosina (Sigma[®]) 4 µg/ml.
- Ketoconazol (Ketoisdin[®]) 20 mg/ml.

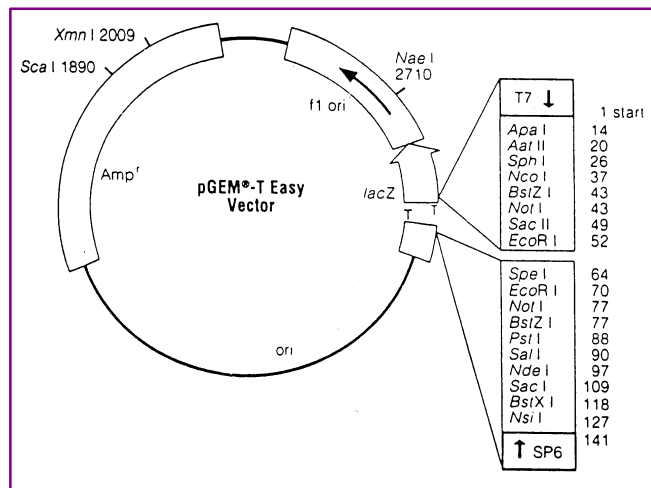
3.5.- Enzimas.

- Taq ADN polimerasa (Perkin-Elmer[®]).
- RNAsa libre de DNAsa (Boehringer Mannheim[®]).

- ADN ligasa del Fago T4 (Pharmacia Biotech[®]).
- *Klenow* (Pharmacia Biotech[®]).
- Proteinasa K (Boehringer Mannheim[®]).
- Antidigoxigenina acoplada a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim[®]).

3.6.- Vector de transformación.

- pGEM-T Easy (Promega[®]).



3.7.- Cepas bacterianas.

- XL-1-blue (Stratagene[®]).
- XL-2-Blue MRF' (Stratagene[®])
- JM 109 (Promega[®])

3.8.- Cepas de *Acanthamoeba*.

Las cepas control empleadas en este trabajo fueron las adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC), del Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) y cedidas por el Dr. Maciver, del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Edimburgo.

Especie	Cepa	Origen
<i>A. astronyxis</i>	ATCC 30137	Suelo (EE.UU.)
<i>A. astronyxis</i>	ATCC 30391	Lago (EE.UU.)
<i>A. castellanii</i>	ATCC 30010	Strain Neff - Suelo (EE.UU.)
<i>A. castellanii</i>	ATCC 50492	Queratitis (India)
<i>A. castellanii</i>	ATCC 50498	Córnea humana (EE.UU.)
<i>A. divionensis</i>	ATCC 50238	Clon AA2 (Gran Bretaña)
<i>A. divionensis</i>	ATCC 50251	Clon AA1 (Gran Bretaña)
<i>A. polyphaga</i>	ATCC 30461	Córnea humana (EE.UU.)
<i>A. polyphaga</i>	ATCC 50495	Córnea humana (EE.UU.)
<i>A. polyphaga</i>	ATCC 30899	Aspirado pulmonar (EE.UU.)
<i>A. astronyxis</i>	CCAP 1534-1	Agua (EE.UU.)
<i>A. griffini</i>	CCAP 1501-4	Suelo (EE.UU.)
<i>A. polyphaga</i>	CCAP 1501-18	Suelo (EE.UU.)
<i>A. palestinensis</i>	CCAP 1541-1	Suelo (Israel)
<i>A. mauritaniensis</i>	Maciver mau	Suelo (Mauritania)
<i>A. palestinensis</i>	Maciver gtg	Suelo (Reino Unido)

Tabla 2: Especies control de *Acanthamoeba*. ATCC: American Type Culture Collection; CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa; Maciver: Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Edimburgo.

3.9.- Aislados de amebas de vida libre.

Una vez diseñados y puestos a punto los cebadores y se procesaron una serie de amebas de vida libre aisladas, concretamente de 37 estuches portales de usuarios de lentes de contacto de periodicidad mensual, para estudiar la presencia de las especies estudiadas en estos recipientes.

Fueron también procesadas una serie de aislados de amebas procedentes de muestras biológicas que fueron remitidas desde el Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza y del departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Cepa	Origen
Z-11	Córnea
Z-12	Córnea
Z-13	Córnea
Z-14	Córnea
Z-18	Córnea
Z-19	Córnea
Z-27	Córnea
Z-28	Córnea
Z-29	Córnea

Tabla 3: Aislados de amebas de vida libre cedidos por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza.

Cepa	Origen
BCN Y30GPS	Córnea
BCN 1	Agua
BCN 2	Aspirado pulmonar
BCN 3	Córnea
BCN 4	Córnea
BCN 5	Córnea
BCN 6	Córnea
BCN 7	Ganglio linfático

Tabla 4: Aislados de amebas de vida libre cedidos por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

3.10.- Patrones de peso molecular para electroforesis de ADN.

- ADN del fago Lambda gt11 digerido con *Hind* III (Daniels y col., 1983). Fragmentos: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb. (Boehringer Mannheim®).
- Marcador de peso molecular de 100 pb. Fragmentos desde 100 hasta 2.000 pb (Pharmacia Biotech®).

3.11.- Oligonucleótidos sintéticos.

Cebador	Secuencia 5'-3'
M13 Reverse	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
M13-40 Forward	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
T7	TAATACGACTCACTATA
Acan-1 forward	TCCCCTAGCAGCTTGIG
Acan-1 reverse	GTTAAGGTCTCGTTCGTTA
AA-2 forward	CACACTTGCCGAGAATAAAT
AA-2 reverse	GTCTTACTACACAGGGCTTC
AD-1 forward	ACCTTCGGGCTCAACTC
AD-1 reverse	TCTTCATCCTGCTCGTCACC
AP-5 forward	ACCTTCGGGCTCAACTC
AP-5 reverse	AGAAGAGGACGAGCAGTGG

Tabla 5: Oligonucleótidos sintéticos empleados en las reacciones de amplificación por PCR.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Cebador	Secuencia 5'-3'
OPC-01	TTCGAGCCAG	OPC-11	AAAGCTGCGC
OPC-02	GTGAGGCGTC	OPC-12	TGTCATCCCC
OPC-03	GGGGGTCTTT	OPC-13	AAGCCTCGTC
OPC-04	CCGCATCTAC	OPC-14	TGCGTGCTTG
OPC-05	GATGACCGCC	OPC-15	GACGGATCAG
OPC-06	GAACGGACTC	OPC-16	CACACTCCAG
OPC-07	GTCCCACGA	OPC-17	TTCCCCCCAG
OPC-08	TGGACCGGTG	OPC-18	TGAGTGGGTG
OPC-09	CTCACCGTCC	OPC-19	GTTGCCAGCC
OPC-10	TGTCTGGGTG	OPC-20	ACTTCGCCAC

Tabla 6: Oligonucleótidos sintéticos OPC empleados en las reacciones de amplificación RAPD.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Cebador	Secuencia 5'-3'
OPD-01	ACCGCGAAGG	OPD-11	AGCGCCATTG
OPD-02	GGACCCAACC	OPD-12	CACCGTATCC
OPD-03	GTCGCCGTCA	OPD-13	GGGGTGACGA
OPD-04	TCTGGTGAGG	OPD-14	CTTCCCAAG
OPD-05	TGAGCGGACA	OPD-15	CATCCGTGCT
OPD-06	ACCTGAACGG	OPD-16	AGGGCGTAAG
OPD-07	TTGGCACGGG	OPD-17	TTTCCCACGG
OPD-08	GTGTGCCCCA	OPD-18	GAGAGCCAAC
OPD-09	CTCTGGAGAC	OPD-19	CTGGGGACTT
OPD-10	GGTCTACACC	OPD-20	ACCCGGTAC

Tabla 7: Oligonucleótidos sintéticos OPD empleados en las reacciones de amplificación RAPD.

4.- MÉTODOS.

4.1.- Cultivos de *Acanthamoeba*.

En este apartado se refleja la relación de las distintas cepas de *Acanthamoeba*, empleadas en este estudio.

4.1.1.- Cepas adquiridas del American Type Culture Collection.

Las distintas cepas de *Acanthamoeba* adquiridas del ATCC fueron cultivadas y mantenidas en su estadio de trofozoíto empleando el medio líquido ATCC PYG-712, enriquecido con glucosa 5 M a 25° C, en botes de cultivo de fondo plano, para un mejor manejo y control del crecimiento de las cepas. Para evitar contaminaciones se le añadió a los medios de cultivo gentamicina a una concentración de 40 µg/ml. Para el buen mantenimiento de los cultivos en su forma de trofozoíto se realizaron resiembras de medio de cultivo cada dos semanas.

4.1.2.- Cepas adquiridas del Culture Collection of Algae and Protozoa.

Las distintas cepas de *Acanthamoeba* adquiridas del CCAP fueron cultivadas y mantenidas en su estadio de trofozoíto empleando el medio PPG a 25° C. Para el mejor manejo y observación de las cepas estas se mantenían en botes de cultivo de fondo plano. En este medio de cultivo se le añadió gentamicina, al igual que en el caso anterior a la concentración de 40 µg/ml. Para mantener los cultivos en fase logar ítmica de crecimiento se realizaron pases cada dos semanas.

4.1.3.- Aislados de estuches portales.

Cada estuche portante fue lavado con 250 ml de PBS. Este volumen fue filtrado al vacío, empleando para ello filtros MILLIPORE® de 0'45 μ m de diámetro de poro, para retener así los quistes y trofozoitos. Los filtros se sembraron de forma invertida sobre placas petri, con agar no nutritivo al 2% en agua destilada estéril. Las placas se sellaron con parafilm y se cultivaron a 25° C. Al cabo de 48 horas se retiraron los filtros y se añadió una suspensión de *E. coli*, inactivados por calor, como nutrientes de las posibles amebas. Las placas fueron de nuevo selladas y cultivadas de forma invertida. Cada 24 horas eran examinadas para comprobar la presencia de amebas. Una vez identificadas, bajo un microscopio invertido, se aislaron para cultivarlas independientemente. Para el cultivo de estos aislados en medios líquidos, las acanthamoebas se cultivaron previamente en el medio de axenificación, para facilitar su acomodo y la eliminación de contaminantes que pudieran traer en origen. A este medio se le añadió previamente Gentamicina, a una concentración de 80 mg/ml y un antifúngico como la 5-Fluorocitosina, a una concentración de 4 μ g/ml.

4.1.4.- Aislados de lentes de contacto.

Las lentes de contacto se lavan en PBS y el líquido empleado se cultiva en placas de agar al 2%. Simultáneamente las propias lentes también son cultivadas en las mismas condiciones introduciéndolas en las placas de agar.

4.1.5.- Aislados de córneas.

Las muestras obtenidas de las córneas de pacientes con algún ojo afectado fueron

obtenidas a partir de raspados en el epitelio ocular. Éstos se introdujeron en agar blando (2 %) y se les añadió solución de Page. En este medio se mantuvieron a 37° C durante siete días. Transcurrido este periodo se observa la placa y se comprueba si existe crecimiento de amebas en el medio de cultivo. Si no aparecían amebas las placas eran desechadas.

4.1.6.- Aislado de ganglio linfático.

Tras biopsia del ganglio linfático, este material se resuspende en solución salina estéril y se cultiva en las mismas condiciones que los aislados del apartado 4.1.5.

4.1.7.- Aislado de pulmón.

Tras biopsia del pulmón, este material se resuspende en solución salina estéril y se cultiva en las mismas condiciones que los aislados de del apartado 3.1.5.

4.2.- Cultivo de *Escherichia coli*.

Los cultivos de las diferentes cepas de *E. coli* se realizan en LB líquido a 37° C, en agitación, o en placas de cultivo con LB-agar, en ambos medios se mantiene a 37° C durante toda la noche.

En el caso de que las *E. coli* cultivadas estuvieran transformadas con los plásmido pGEM-T al medio de cultivo se añade Ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, para evitar que crezcan bacterias que no contengan el plásmido que les confiere resistencia al antibiótico.

4.3.- Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.

El aislamiento de ADN se realizó empleando los siguientes protocolos de extracción.

4.3.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Acanthamoeba*.

Para la purificación del ADN genómico se empleó el protocolo descrito por Medina-Acosta y Cross en 1993 con algunas modificaciones:

1. Partir de una cantidad inicial de 10^7 - 10^8 trofozoítos.
2. Centrifugar a 1000 xg durante 10 minutos.
3. Lavar con 1 ml de PBS. Centrifugar 1 ml del cultivo de parásitos a 3.000 xg durante 15 minutos a 4° C.
4. Retirar el sobrenadante y lavar dos veces con tampón PBS estéril, para eliminar los restos de medio de cultivo.
5. Retirar de nuevo el sobrenadante y añadir al precipitado 700 μ l de solución de lisis (EDTA 0'5 M; Sarcosyl 10 gr/l) y 0'25 mg/ml de proteinasa K. Incubar a 55° C durante 1 hora. Para romper todas las membranas del parásito y dejar así su ADN libre.
6. Añadir un volumen de fenol y centrifugar a 4° C durante 10 minutos a 13.000 xg, para eliminar los restos proteicos y lipídicos resultantes de la digestión celular.
7. Recuperar la fase acuosa, añadir un volumen de la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 4° C durante 10 minutos a 13.000 xg.
8. Realizar un último lavado de la fase acuosa añadiendo un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) y centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior para eliminar restos de fenol.

9. Recuperar de nuevo la fase acuosa y precipitar el ADN extraído añadiendo un volumen de isopropanol, frío, y 0'1 volumen de acetato de sodio 3 M. Para favorecer la precipitación, incubar la mezcla durante una hora a -80° C o toda la noche a -20° C.
10. Transcurrido ese tiempo centrifugar la muestra a 13.000 xg durante 10 minutos y eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
11. Añadir 1 volumen de etanol al 70%, frío, para eliminar los restos de sales precipitadas, y centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior.
12. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado en estufa a 37° C o en una centrífuga al vacío. Resuspender el precipitado en un volumen de 50 µl de agua bidestilada estéril.
13. Añadir RNAsa (Boehringer Mannheim®) a una concentración de 100 µg/ml e incubar durante 1 hora a 37° C. Volver a purificar el ADN restante mediante fenol-cloroformo y precipitar de la misma forma descrita en los apartados 11 y 12.

4.3.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.

En los casos en que se necesitaba obtener alta concentración de ADN plasmídico o que este tuviese un alto grado de pureza se empleó el kit “Quantum Prep Plasmid Miniprep” de Bio-Rad® siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el resto de los casos se empleó el kit “Flexiprep” de Pharmacia Biotech® siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante o las minipreps rápidas de litio cuyo protocolo se relata a continuación:

1. Centrifugar 1'5 ml de cultivo de bacterias transformadas a 4000 xg 10 minutos a 4° C.
2. Eliminar el sobrenadante y añadir 200 µl de solución TELT y resuspender con la punta vigorosamente.
3. Añadir 200 µl de fenol- cloroformo.

4. Agitar durante 5 minutos mediante “vortex”.
5. Centrifugar 2 minutos a 13000 xg.
6. Recoger 175 μ l de la fase acuosa y añadir 2 volúmenes de etanol frío.
7. Centrifugar 5 minutos a 13000 xg.
8. Lavar con 1 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente.
9. Eliminar el sobrenadante y secar el ADN en estufa a 37° C o en una centrifuga a vacío.
10. Resuspender el ADN plasmídico en 30 μ l de agua bidestilada.

4.4.- Purificación de productos amplificados por PCR.

4.4.1.- Purificación desde geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Estos geles se preparan con agarosa de bajo punto de fusión, *low melting*, a concentraciones no superiores a 0'8 %, y se emplean para recuperar fragmentos de ADN separados electroforéticamente. Una vez visualizado el fragmento de interés se corta el segmento del gel que lo contiene. Posteriormente se disuelve en tampón TE, calentándolo en un baño a 65° C, para disolver la agarosa, y aislar al fragmento de ella, quedando así solubilizado en el tampón. Se deja enfriar a temperatura ambiente. La extracción del fragmento se realiza añadiendo un volumen de fenol equilibrado a pH 8 con Tris-HCl 0'1 M, mezclando y centrifugando a 13.000 xg a 4° C durante 10 minutos, separándose la fase acuosa de la orgánica, quedando la agarosa en la interfase. La extracción se continúa siguiendo el protocolo ya expuesto para la extracción de ADN en el apartado 3.2.1. Una vez aislado, se precipita con dos volúmenes de etanol en presencia de acetato amónico o de cloruro de litio y se lava con un volumen de etanol al 70 %, frío. El precipitado se seca y se disuelve en 20 μ l de agua bidestilada estéril (Sambrook y col, 1989).

4.4.2.- Purificación desde geles de agarosa.

Para la elución de fragmentos de ADN de tamaño específico tras su separación electroforética a partir de geles de agarosa, se corta el segmento del gel que contiene el fragmento a aislar, y para su aislamiento se emplea el kit comercial “*Quiaex gel extraction Kit*” de Quiagen[®]. Este sistema permite extraer fragmentos de ADN de tamaños desde 0'04 hasta 50 kb mediante su unión a partículas de sílica.

4.4.3.- Purificación de productos de amplificación por PCR directamente de la mezcla de reacción.

Para la purificación de productos amplificados por PCR se emplea en kit comercial “*High Pure PCR Product Amplification*” de Boehringer Mannheim[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.5.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

Para cuantificar el ADN se utilizó el espectrofotómetro “Gene Quant” (Pharmacia-Biotech[®]). Se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm, siendo el coeficiente de extinción $50 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ADN. Y el marcador de peso molecular “Weight-Marker II” (Roche[®]) para comparar la intensidad del ADN con la intensidad de las distintas bandas del marcador tras la realización de una electroforesis en un gel de agarosa al 0'8 %.

4.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de amplificación mediante PCR se realizaron en los termocicladores GeneAmp PCR System 9600 de Perkin-Elmer® y Linus Autocicler Plus.

- PCR desde colonias de *E. coli* aisladas de LB sólido en placas Petri: Para un volumen final de reacción de 25 μ l se emplearon 12'5 picomoles de los cebadores T7 y M-13 Reverse, 1 colonia de *E. coli* y 0'25 unidades de *Taq* polimerasa. Los ciclos de amplificación empleados fueron: ciclo inicial de 3 minutos a 94° C; 40 ciclos de 1 minuto a 92° C, 1 minuto a 50° C y 1'5 minutos a 72° C; y un ciclo final de 10 minutos a 72° C.
- PCR desde cultivo de *E. coli* en medio LB líquido: Las condiciones de PCR son iguales a las anteriores pero la muestra utilizada es diferente. Para preparar la muestra se toman 50 μ l del cultivo y se incuban a 95° C durante 10 minutos para lisar las bacterias. A continuación se centrifugan durante 10 minutos. Se toma 1 μ l del sobrenadante y se añade a la reacción de PCR, empleando los mismos ciclos que en el apartado anterior.
- PCR desde plásmido: Las condiciones de PCR son iguales a las anteriores pero como muestra se emplean 50 ng de plásmido recombinante.
- PCR con los cebadores SL y T7: Un volumen final de 25 μ l de reacción contiene 12'5 picomoles de cada cebador, 20 ng de ADN plasmídico y 0'25 unidades de *Taq* polimerasa. Los ciclos de amplificación empleados fueron: un ciclo inicial de 3 minutos a 94° C; 40 ciclos de 1 minuto a 92° C, 1 minuto a 50° C y 1'5 minutos a 72° C; y un ciclo final de 10 minutos a 72° C.
- PCR con las parejas de cebadores Acan-1, AA-2, AD-1 y AP-5: Para un volumen final de 50 μ l se utilizaron 50 picomoles de cada cebador, 10 ng de ADN de *Acanthamoeba* y 0'25 unidades de *Taq* polimerasa. Los ciclos de amplificación utilizados fueron: un ciclo

inicial de 3 minutos a 94° C; 30 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a la temperatura de anillamiento de cada una de las parejas de cebadores y 1'5 minutos a 72° C; y un ciclo final de 10 minutos a 72° C.

- Las condiciones de amplificación para la secuenciación fueron las siguientes: un ciclo inicial 2 minutos a 95° C; 25 ciclos de 36 segundos a 95° C, 36 segundos a la temperatura de anillamiento del cebador y 84 segundos a 72° C; y un ciclo final de 10 minutos a 72° C.

Para emplear la técnica de RAPD se optimizaron las condiciones de amplificación. Se trabajó con distintas condiciones de reacción, dependiendo de los cebadores y de la muestra utilizada. La concentración del tampón de reacción y de los nucleótidos empleados fue siempre la misma, siendo de 1X y 200 µM de cada nucleótido, respectivamente.

- RAPD: Para un volumen final de 30 µl de reacción se emplearon 20 picomoles de cebador OPC u OPD, 0'1, 1 y 10 ng de ADN de *Acanthamoeba* y 0'25 unidades de *Taq* polimerasa y 1'5 mM de Cl₂Mg. Los ciclos de amplificación empleados fueron: un ciclo inicial de 2 minutos a 94° C; 40 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 54° C y 1 minuto a 72° C; y un ciclo final de 7 minutos a 72° C.

4.7.- Electroforesis de ácidos nucleicos.

Para el análisis de los ácidos nucleicos aislados y de los amplificados se emplearon soportes de agarosa. Para la secuenciación de los fragmentos clonados se emplearon geles de poliacrilamida.

4.7.1.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La agarosa es un polímero lineal formado por la repetición de unidades de $\beta(1-3)$ Galactosil- $\alpha(1-4)$ -(3, 6 anhidro) galactosa de elevada longitud, que forma una estructura rígida con poros, cuyo tamaño va a depender de la concentración de la agarosa.

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR, fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa, sumergidos en tampón TAE 1 X, utilizando cubetas submarinas de desarrollo horizontal bajo una diferencia de potencial de 5V/cm. Los porcentajes de agarosa empleados en la elaboración de los geles oscilaron entre el 0'8 y 2 % en tampón TAE, dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Las muestras se prepararon añadiendo 1 μ l de tampón de carga para ADN por cada 6 μ l de muestra de ADN. Para la visualización del ADN se añadió al gel 0'2 μ g/ml de Bromuro de Etidio y se observó a través de un transiluminador de luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm. La documentación fotográfica se obtuvo mediante el Gel Printer Mitsubishi P-90.

4.7.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida y urea.

El gel de poliacrilamida es un enrejado tridimensional de fibras lineales de acrilamida unidas por puntos de cruce consistentes en moléculas de bisacrilamida. El tamaño de los poros del gel depende principalmente de la concentración de acrilamida que contenga y de ello va a depender el efecto de tamizado que van a sufrir las moléculas al avanzar durante la electroforesis. Son geles de alto poder resolutivo que permiten distinguir entre fragmentos de ADN que difieren en una sola base por lo que estos geles se utilizaron para la secuenciación.

Los geles desnaturizantes de poliacrilamida y urea fueron preparados a partir del *Ready mix Grado-ALF* de Pharmacia Biotech® cuya composición es: acrilamida-bis 6 %, urea

7 M, TBE 1 X, temed y 450 μ l de persulfato amónico al 10 %. El tampón utilizado en la reacción es TBE 0'6 X.

La electroforesis y el posterior análisis de los datos se realizó en un secuenciador automático ALF-Express (*Automated Laser Fluorescent-Express*) de Pharmacia Biotech[®] que consta de un sistema de electroforesis y de detección por láser-fluorescencia y un ordenador externo con un Software AM V 3.0 para el control del proceso y almacenaje de los datos.

Los fragmentos de ADN que migran a través del gel han de estar marcados con un cromóforo fluorescente para poder ser excitados por el láser y así poder ser captada su señal por los fotodetectores que se encuentran detrás del gel.

Las muestras se preparan añadiendo 4 μ l de tampón de carga a 6 μ l de muestra. La mezcla se incuban a 95° C, 5 minutos, para desnaturalizar las moléculas de ADN y se colocan en hielo, para evitar su renaturalización y se cargan de esta forma en el gel.

4.8.- Inmovilización de ácidos nucleicos.

4.8.1.- Southern blot.

Para la hibridación con sondas específicas, los fragmentos de ADN amplificados por PCR y separados electroforéticamente en geles de agarosa, son transportados mediante una transferencia alcalina descendente, a membranas de *nylon* cargadas positivamente (*Nylon membranes positively charged*, Boehringer Mannheim[®]) según el método de transferencia alcalina de ADN, donde quedan retenidos o inmovilizados. para su posterior hibridación con las sondas específicas diseñadas (Sambrook y col, 1989).

Para poder realizar esta transferencia, el ADN tiene que ser previamente desnaturalizado para lo que se sumerge el gel donde se ha realizado la electroforesis, durante

15 minutos, en una solución de NaOH 0'5 M y NaCl 1'5 M. Una vez transcurrido este tiempo se coloca el gel sobre la membrana de *nylon* y se hace pasar a los fragmentos de ADN empleando un flujo constante de NaOH 0'4 M, que se emplea como tampón de transferencia. Para crear este flujo se crea una torre con trozos de papel de filtro secos del mismo tamaño que el gel y de unos dos o tres centímetros de altura sobre los que se coloca cinco papeles de Whatman 3MM, de las mismas dimensiones que los anteriores, los cuatro inferiores secos y el superior humedecido con tampón de transferencia. Sobre éste se coloca la membrana de *nylon* cargada positivamente, también impregnada con el tampón de transferencia. Sobre esta membrana se coloca el gel de agarosa ya tratado con la solución desnaturizante. Para evitar que el tampón fluya por fuera de la membrana y no pase a través de ella, se enmarca al gel sobre la membrana con unas tiras de plástico. Sobre el gel se colocan otros tres papeles Whatman 3MM también mojados en el tampón de transferencia. Por último se coloca un puente de papel Whatman 3MM que conecta a un recipiente que contenga el tampón de transferencia, con la parte superior de la torre, lo que va a permitir el flujo constante de NaOH 0'4 N a través del gel hacia la membrana de *nylon*. La parte superior de la torre se cubre con un papel plástico que va a evitar que se evapore el tampón antes de terminar su transferencia y se pone un pequeño peso encima para que haya un contacto más íntimo entre los componentes.

Tras una hora de transferencia el tampón habrá atravesado al gel y la membrana, arrastrando a los fragmentos de ADN desde el gel quedando retenidos en la membrana. Se retiran todos los papeles y se lava la membrana con SSC 2X durante 3 minutos y el ADN se fija mediante exposición durante 3 minutos a la luz ultravioleta en un transiluminador.

Si el ADN a transferir es de gran tamaño, antes de la transferencia se sumerge el gel en HCl 0'25 N durante 30 minutos, en suave agitación, con la finalidad de depurarlo y así facilitar la transferencia, posteriormente el gel se neutraliza sumergiéndolo en NaOH 0'4 N durante 20 minutos y a continuación se realiza la transferencia como se explicó anteriormente.

En el caso de transferencia de productos de bajo peso molecular, como son los productos amplificados por PCR o los productos de la digestión de un plásmido no son necesarios los pasos de depurinación con ácido clorhídrico ni de neutralización.

4.8.2.- Dot blot.

En el desarrollo de esta técnica el ADN es fijado directamente a la membrana de *nylon* sin necesidad de realizar electroforesis y transferencias previas, según el protocolo que es expone a continuación:

1. Incubar a 94° C 1 μ g de ADN de *Acanthamoeba*, durante 10 minutos.
2. Colocar en hielo para evitar la renaturalización.
3. Añadir una gota de ADN sobre la membrana de *nylon* y esperar a su secado.
4. Exponer la membrana mediante durante 3 minutos a luz ultravioleta.
5. Esta membrana es hibridada posteriormente como se indica en el apartado 4.10.

4.9.- Marcaje de sondas.

4.9.1.- Marcaje de sondas con digoxigenina empleando *Taq* polimerasa.

El marcaje de sondas con digoxigenina mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se realizó utilizando una mezcla de nucleótidos en la que uno de ellos está marcado con digoxigenina. Las condiciones de la reacción son las siguientes: Para un volumen final de 50 μ l de reacción se utilizó 100 μ M de dATP, dCTP, dGTP y dTTP y 35 μ M de dUTP marcado con digoxigenina, tampón de PCR 1X, 5 picomoles de cada cebador, 1'5 unidades de *Taq* polimerasa y 10 ng de ADN muestra. Los ciclos de PCR utilizados fueron:

un ciclo inicial de 2 minutos a 95° C; 35 ciclos de 1 minuto 95° C, 1 minuto a la temperatura de anillamiento de los cebadores y 1 minuto a 72° C; con un ciclo final de 10 minutos a 72° C.

El producto obtenido se sometió a electroforesis en geles de agarosa y purificado mediante el *Quiaex gel extraction kit* de Quiagen.

4.9.2.- Marcaje de sondas con digoxigenina empleando *Klenow*.

Esta técnica consiste en marcar fragmentos de ADN con Digoxigenina-11-2', 3'-dideoxiuridin-5'-trifosfato (Dig-11-dUTP), para ser utilizados en posteriores ensayos de hibridación. Este proceso se lleva a cabo utilizando la actividad polimerasa 5'-3' de la enzima *Klenow*, que hace copias a partir del extremo 3' de cebadores hexanucleótidos inespecíficos, unidos previamente al fragmento de ADN, incorporando los nucleótidos A, G, C, T y Dig-11-dUTP a lo largo del fragmento.

El rendimiento del marcaje de las sondas se comprobó antes de su uso en los ensayos de hibridación. Para ello se prepararon diluciones seriadas de la sonda elaborada con concentraciones de 10 picog/ μ l a 10 fentog/ μ l y a continuación se cuantificó. Se añadió una gota de cada una de las diluciones sobre una membrana de *nylon* cargada positivamente, se fijó el ADN a ella irradiando con luz UV durante tres minutos y se realizó el proceso de detección inmunológica descrito en el apartado 4.12, para comprobar así la eficacia del marcaje.

4.10.- Hibridación ADN:ADN con sondas marcadas con digoxigenina.

1. Prehibridar la membrana en solución de prehibridación durante 1 hora a 68° C.
2. Disolver la sonda marcada en tampón de prehibridación e incubarla durante 10

minutos a 95° C para su desnaturalización. La concentración óptima de sonda en la mezcla de hibridación debía de ser entre 10-100 ng de ADN marcado por ml.

3. Hibridar la membrana con la sonda de 8 a 12 horas, a 68° C.
4. Lavar la membrana la mezcla SSC 2X-SDS 0'1 % dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar la membrana con SSC 0'1X-SDS 0'1 % dos veces durante 5 minutos a 68° C.

De esta forma ya se tiene a la membrana preparada para la detección inmunológica del producto hibridado.

4.11.- Detección inmunológica del producto hibridado.

Este sistema de revelado se realiza utilizando anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. Todos los pasos del protocolo se realizan a temperatura ambiente y en agitación suave.

1. Lavar los filtros durante 2 minutos con 20 ml. de tampón 1 y Tween 20, 0.3 % (w/v).
2. Incubar las membranas durante 30 minutos en 20 ml. de tampón 2.
3. Realizar una dilución 1:5000 del anticuerpo anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina en 20 ml. de tampón 2.
4. Incubar los filtros durante 30 minutos con 20 ml. de solución de anticuerpos diluidos.
5. Lavar 2 veces los filtros durante 15 minutos con 20 ml. de tampón 1.
6. Equilibrar las membranas durante 2 minutos con 20 ml. de tampón 3.
7. Incubar las membranas con la solución de substratos cromogénicos hasta la aparición de un precipitado de color.

4.12.- Ligación.

El producto de amplificación obtenido mediante RAPD es purificado, bien a partir de la mezcla de reacción de la amplificación o tras una electroforesis, seleccionando los fragmentos amplificados a clonar.

Para la ligación de estos productos amplificados se empleó el vector pGEM-T Easy, debido a que es un sistema que presenta muchas ventajas para el clonaje de productos de PCR. Este vector presenta en su sitio de inserción residuos de timina en cada uno de los extremos 3' terminales. Los productos amplificados mediante PCR como resultado de la actuación de la enzima *Taq* polimerasa presentan en sus extremos 3' residuos de adenina. Esto facilita la ligación del producto amplificado con el vector. El clonaje en este vector se realiza según el protocolo recomendado por el fabricante (Promega®).

4.13. Transformación de ADN de *Acanthamoeba* en *E. coli*.

Los productos de la reacción de clonaje se utilizaron para transformar células competentes.

4.13.1- Preparación de *E. coli* competentes.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Inocular 1-2 ml de un cultivo de *E. coli* en 100 ml de medio LB.
2. Incubar a 37° C hasta que las células alcancen una densidad óptica a 550 nm de 0'6.
3. Enfriar en hielo 10 minutos.
4. Transferir las células a un tubo de centrifuga y centrifugar a 10.000 xg durante 5

minutos, a 4° C.

5. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en un volumen de Cloruro de Calcio 100 mM, previamente enfriado en hielo.
6. Centrifugar a 5.000 xg durante 5 minutos a 4° C.
7. Añadir medio volumen de Cloruro de Calcio 100 mM. Resuspender violentamente y dejar en hielo.
8. Centrifugar a 5.000 xg durante 5 minutos a 4° C.
9. Resuspender en 10 ml de Cloruro de Calcio 100 mM.
10. Para almacenar las células se añade el 20 % de glicerol y se guardan a -20° C.

4.13.2.- Transformación de células bacterianas competentes.

Las células competentes transformadas fueron las cepas XL1-Blue y XL2-Blue, preparada por nosotros y la cepa JM109 competente, de Promega[®], empleadas ambas para transformar con el vector pGEM-T Easy. La transformación de las células competentes con la mezcla de ligación se realizó mediante el siguiente protocolo:

Partir de 200 μ l de bacterias competentes y cantidades de plasmídico entre 1-50 ng.

1. Mantener estas diluciones en hielo durante 30 minutos.
2. Someter a las diluciones a un choque térmico consistente en someterlas a 42° C durante 2 minutos y luego enfriarlas nuevamente en hielo durante 10 minutos.
3. Añadir 300 μ l de medio LB no selectivo e incubar durante 1 hora a 37° C con agitación para permitir la recuperación de las bacterias.
4. Extender 100 μ l del cultivo en placas de LB-agar con ampicilina. Incubar las placas a 37° C durante toda la noche.

4.13.3.- Selección de los clones recombinantes de *E. coli*.

La selección de los clones recombinantes se realizó según dos características presentes en los vectores empleados en la transformación:

- Los vectores contienen un gen que les confiere resistencia a la ampicilina. El medio se elabora con este antibiótico. Las células que crecen son las que contienen el vector.
- Estos plásmidos contienen el gen de la β -galactosidasa de *E. coli*. En el medio de cultivo se le añade el cromógeno X-gal, además de IPTG que actúa como inductor de este gen. Si el plásmido contiene el inserto, se altera la pauta de lectura del gen, ya que el sitio de inserción está dentro de ésta, y las colonias aparecen de color blanco, de lo contrario las colonias aparecen de color azul.

4.13.4.- Análisis de los tamaños de los fragmentos clonados.

Para conocer el tamaño de los insertos introducidos en el vector, éste se amplificó utilizando los cebadores presentes en el plásmido, el M13-40-Forward y el M 13-Reverse, que flanquean la zona de inserción. Estas reacciones de PCR se llevaron a cabo sin realizar una extracción previa de ADN del plásmido, sino que se emplearon directamente las colonias de *E. coli* como ADN molde. En el primer paso de amplificación de la PCR, en la desnaturalización previa a 94° C, es donde las bacterias se lisan y el ADN que contienen se libera al medio de reacción. De esta forma se obtuvo el ADN del plásmido como molde necesario para la reacción de PCR. Así se agilizó el proceso de verificación de los tamaños de los insertos y se permitió el análisis de un número elevado de muestras. Las colonias seleccionadas se picaron de la placa de siembra con un palillo estéril y se introdujeron directamente en la mezcla de

reacción de PCR, o bien se resembraron en medio LB líquido, amplificando a partir de una alícuota de este cultivo ya crecido. La ventaja que presentó este último proceso, frente a la pica de colonias es que los clones seleccionados ya los tenemos aislados y listos para ser utilizados en posteriores ensayos, mientras que los que se procesaron con el método de pica hay que volverlos a retomar de la placa y resembrarlos. En este caso nos podíamos encontrar con que las colonias estuviesen deterioradas, contaminadas o que en la pica inicial la hubiésemos retirado completamente (Comes y col. 1997).

4.14.- Secuenciación de ADN.

La secuenciación del ADN se realizó según el método descrito por Sanger y col. (1977) a través de una reacción de PCR utilizando los componentes del *ALF-express AutoCycle Sequencing Kit* de Pharmacia Biotech® y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La cantidad de ADN plasmídico utilizada fue de 2 µg y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Pharmacia Biotech®). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador modelo GeneAmp 9600 Perkin Elmer®. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis y el posterior análisis de los resultados se realizó en un secuenciador automático *ALF-express DNA Sequencer* de Pharmacia Biotech®. Las condiciones de electroforesis fueron: 1500 V, 60 mA, 25 W y 57° C. La visualización de los productos y el de los resultados se realiza mediante el programa informático A. M. *Evaluation* v. 3.1.

4.15.- Diseño de cebadores a partir de los fragmentos seleccionados.

Una vez conocida la secuencia y especificidad de los fragmentos aislados se diseñaron los cebadores. Para ello, se empleó el programa informático Gene-Runer 3.05, donde se restringieron los siguientes parámetros: una longitud de 18 a 22 nucleótidos, con una proporción de Guaninas y Citocinas entre el 35 y el 60% y una temperatura de anillamiento teórica entre 40 y 65° C. También se aseguró que no formaran estructuras en horquilla ni dímeros, tanto entre ambos cebadores como consigo mismo.

Para ajustar la temperatura de anillamiento reales para cada pareja de cebadores se probaron temperaturas a partir de 15° C por debajo de la temperatura de anillamiento teórica y por encima de ésta hasta una temperatura máxima de 72° C.

Las condiciones estándar de la reacción que se establecieron fueron: 10 ng de ADN genómico, extraído de trofozoitos de *Acanthamoeba*, 50 picomoles de cada uno de los cebadores y un tampón de PCR (Perking Elmer) con una concentración de MgCl₂ de 1,5 mM y 0,25 U de *Taq* polimerasa (Perking Elmer).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.- Patrones genéticos obtenidos con los diferentes cebadores RAPD.

Las características que presenta la técnica de RAPD para analizar patrones genéticos de diferentes especies se ha aplicado para el análisis de las distintas cepas de *Acanthamoeba* incluidas en este trabajo. Se probaron un total de 40 cebadores de las series OPC y OPD. Los resultados obtenidos fueron diversos; se seleccionaron los cebadores que eran capaces de amplificar simultáneamente todas las cepas incluidas en el estudio y así poder emplear esta técnica como método de elección para la identificación genética. Los patrones obtenidos para cada uno de los cebadores fueron analizados en geles de agarosa al 2 %. Se desecharon los cebadores que no presentaron amplificación con alguna de las cepas, ya que con éstos no se podía comparar los patrones entre las distintas especies.

Tras proceder al ensayo con todos y cada uno de los cebadores RAPD, se observó que con los incluidos dentro del grupo OPC con las numeraciones OPC-14, OPC-15, OPC-18 y OPC-20, se obtenían bandas de amplificación con cada una de las cepas ensayadas. Así mismo y por el mismo motivo, se seleccionaron también los cebadores OPD-1, OPD-3, OPD-6 y OPD-19.

Los tamaños de los fragmentos amplificados con cada uno de los cebadores se muestran en la tabla 8 y 9. En las figuras 18, 19, 20 y 21, se pueden observar los amplificados a los que se hace referencia en dicha tabla, donde se pueden comparar los patrones de amplificación.

	<i>A. astronyxis</i>		<i>A. castellanii</i>		<i>A. divionensis</i>		<i>A. polyphaga</i>	
	30137	30901	30010	50492	50238	50251	30461	50495
OPC-14	2000				1700			2000
		1600					1400	
	1050	1050		900			1200	1250
			750					900
	650		700					800
		480	500		400	400		
OPC-15		2500	3000		2800	2800		
			2400	2400			2500	2500
		2000					2200	
			1600	1800				
	1400	1400	1400					
	1000							1000
	800							
	700	700	750		550	550	600	
OPC-18	600	600	600	600	600	600	600	600
OPC-20			1400				1600	1600
							1400	1400
				1200			1300	1300
			1100		1100	1200	1150	1150
	1000		1000			1000	1000	1000
					950			
	850		800	800	800	800	800	800
			750	700	750	700	700	700
	680	680				650		
	600	600			600			
						550	550	
						450	450	
					400			
						300	300	
			250					

Tabla 8: Tamaños observados en las amplificaciones con los cebadores RAPD OPC-14, OPC-15, OPC-18 y OPC-20.

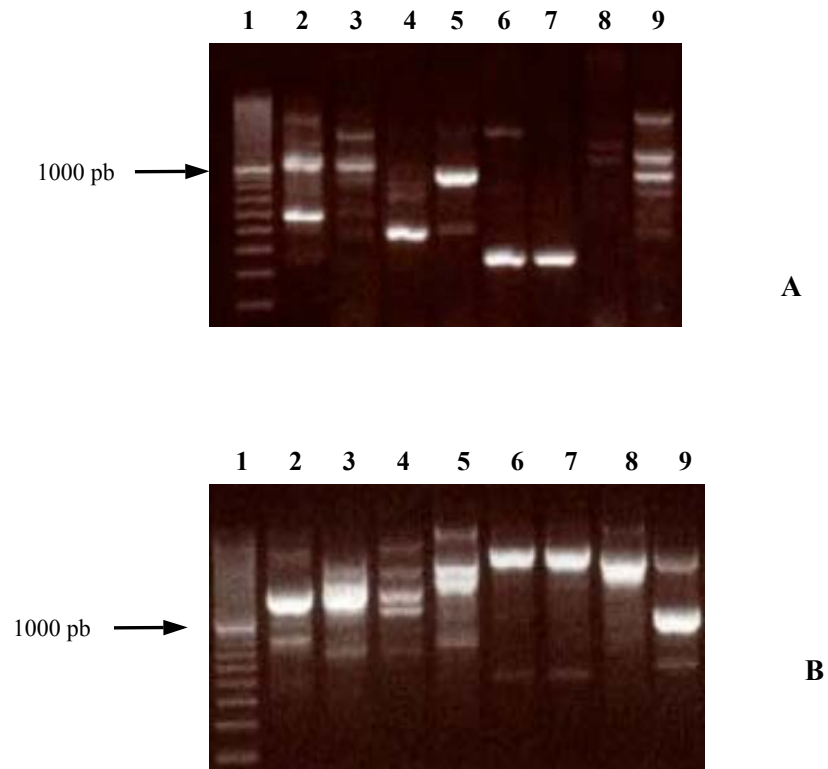


Figura 18:

A) Amplificación obtenida con el cebador OPC-14.

B) Amplificación obtenida con el cebador OPC-15.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. astronyxis* (30901), **4** *A. castellanii* (30010), **5** *A. castellanii* (50492), **6** *A. divionensis* (50238), **7** *A. divionensis* (50251), **8** *A. polyphaga* (30461), **9** *A. polyphaga* (50495).

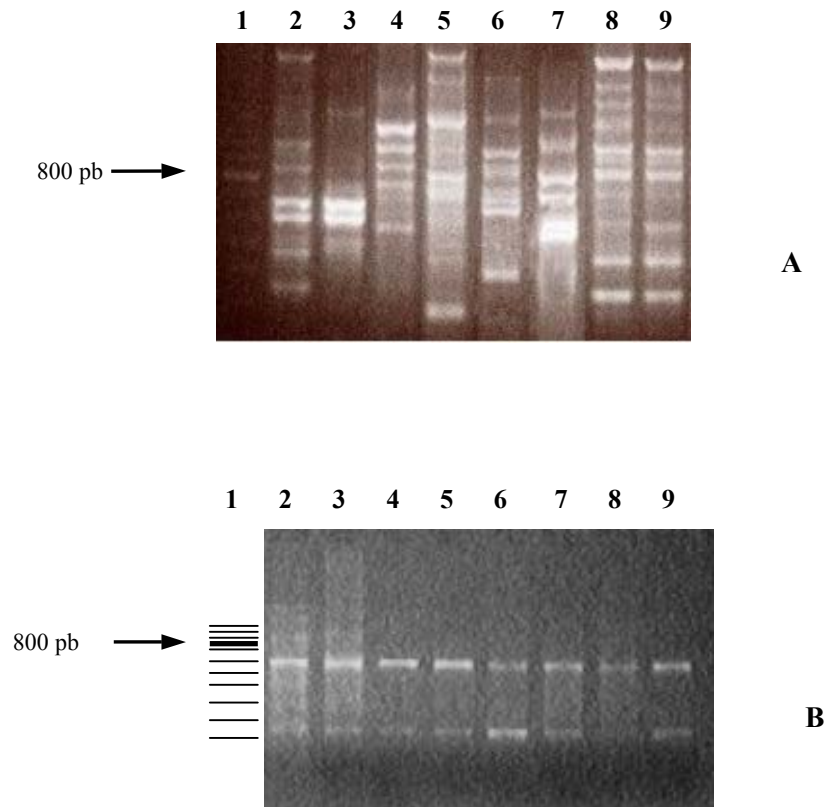


Figura 19:

A) Amplificación obtenida con el cebador OPC-20.

B) Amplificación obtenida con el cebador OPC-18.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, 2 *A. astronyxis* (30137), 3 *A. astronyxis* (30901), 4 *A. castellanii* (30010), 5 *A. castellanii* (50492), 6 *A. divionensis* (50238), 7 *A. divionensis* (50251), 8 *A. polyphaga* (30461), 9 *A. polyphaga* (50495).

	<i>A. astronyxis</i>		<i>A. castellanii</i>		<i>A. divionensis</i>		<i>A. polyphaga</i>	
	30137	30901	30010	50492	50238	50251	30461	50495
OPD-1			1750	1700				
				1550				
	1300		1300					
		1250						1200
	1000	1000		1050	1000	1000	1050	
		950		950	950	950		950
	820	820	850		850	850		800
	780	780		750				750
		700		700	700			
	650		600	600			650	
	520		580				550	
	480	480						
OPD-3					2000			
								1050
		800						950
			700					780
		550		500		480	550	
						400		
	250							
OPD-6		1600						
		1400						
						1400	1450	
					1250			
					1100			
		800	800	900			900	
	720	750		820	820	850	850	780
	650		650		720			
600		600		650	650		550	
			300	600		570		
						250		
OPD-19	2300	2600					2700	
		2300					2300	2200
		1700		1800			1800	
			1400	1500			1400	
	1300						1300	
			1200		1200	1200		1250
	1150		1000					
	1000							
950		800		900	900	950	950	
800	800			800		800		
750	780							
		650						
		550						

Tabla 9: Tamaños observados en las amplificaciones con los cebadores RAPD OPD-1, OPD-3, OPD-6 y OPD-19.

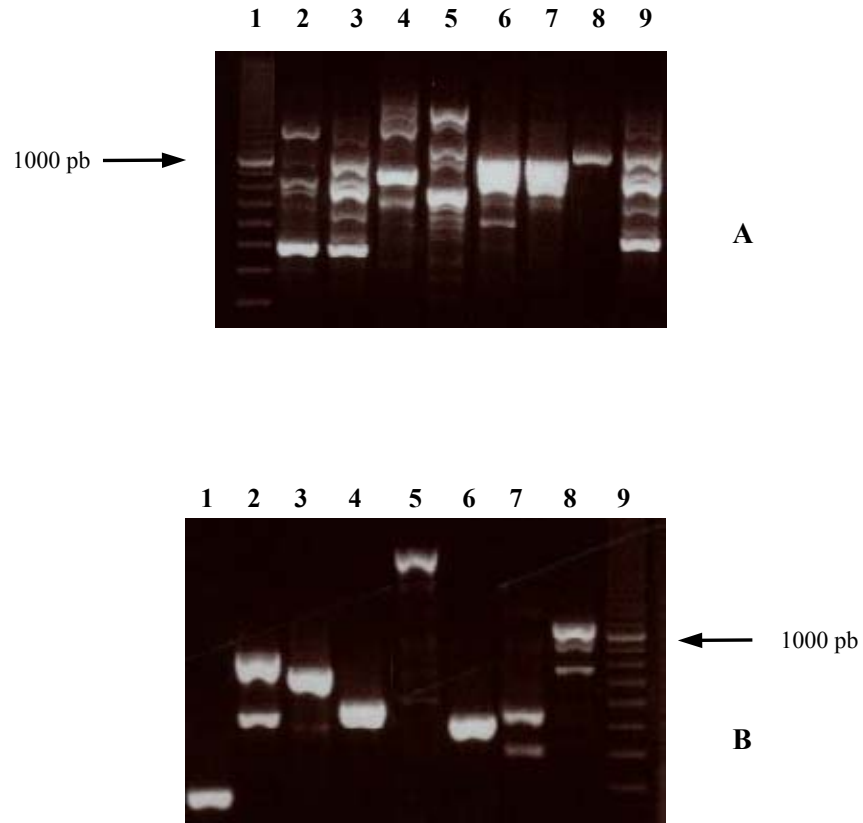


Figura 20:

A) Amplificación obtenida con el cebador OPD-1. **1** Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. astronyxis* (30901), **4** *A. castellanii* (30010), **5** *A. castellanii* (50492), **6** *A. divionensis* (50238), **7** *A. divionensis* (50251), **8** *A. polyphaga* (30461), **9** *A. polyphaga* (50495).

B) Amplificación obtenida con el cebador OPD-3. **1** *A. astronyxis* (30137), **2** *A. astronyxis* (30901), **3** *A. castellanii* (30010), **4** *A. castellanii* (50492), **5** *A. divionensis* (50238), **6** *A. divionensis* (50251), **7** *A. polyphaga* (30461), **8** *A. polyphaga* (50495), **9** Patrón de peso molecular 100 pb.

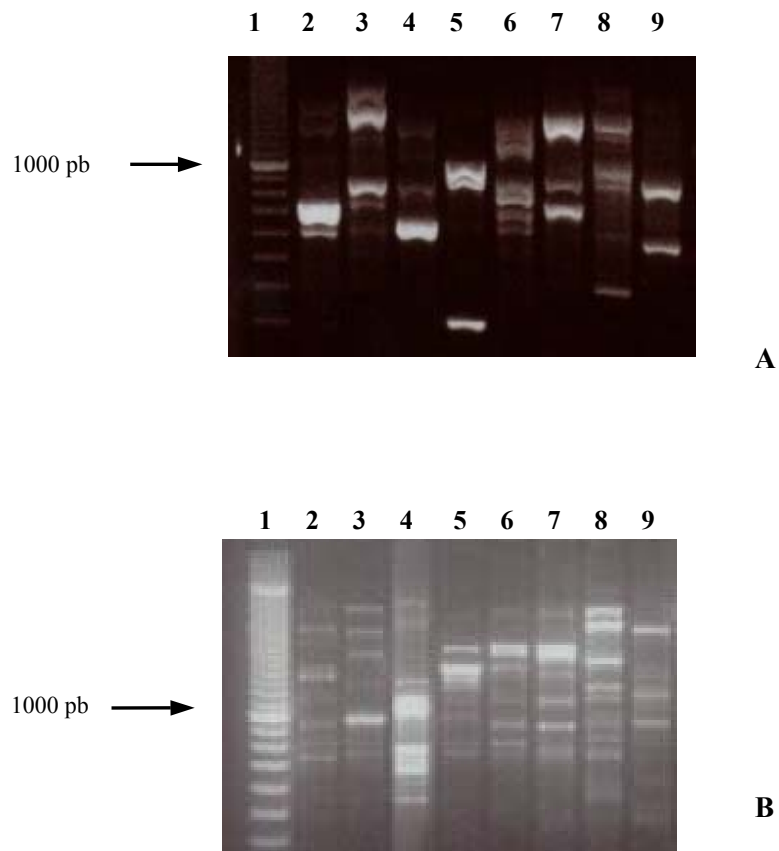


Figura 21:

A) Amplificación obtenida con el cebador OPD-6.

B) Amplificación obtenida con el cebador OPD-19.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. astronyxis* (30901), **4** *A. castellanii* (30010), **5** *A. castellanii* (50492), **6** *A. divionensis* (50238), **7** *A. divionensis* (50251), **8** *A. polyphaga* (30461), **9** *A. polyphaga* (50495).

5.2.- Análisis de los patrones de amplificación RAPD.

En el análisis de los patrones de amplificación podemos observar cómo con alguno de los cebadores y con determinadas especies, se presentaron patrones de bandas que nos permitían caracterizarlas.

5.2.1.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-14.

En el producto de amplificación se puede ver que las cepas de *A. divionensis* presentan un patrón característico, con una banda a la altura de 400 pb, que nos permitió caracterizar a esta especie y diferenciarla del resto. La cepa 50238 de *A. divionensis* presenta además una banda de menor intensidad a la altura de 1700 pb. En las cepas de *A. astronyxis* se observa una banda común a la altura de 1050 pb; el resto del bandeo de estas cepas no presenta ninguna similitud. En los amplificadores de las cepas de *A. castellanii* y de *A. polyphaga* no hay repetitividad, y por tanto no se puede establecer un patrón que permita caracterizarlas (Figura 18-A; Tabla 8).

5.2.2.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-15.

Cuando se amplifica con este cebador, se observa que las cepas de *A. divionensis* presentan un patrón de amplificación repetitivo con una banda característica de alta intensidad a la altura de 2800 pb. Las cepas de *A. astronyxis* comparten una banda de amplificación de alta intensidad a la altura de 1400 pb, aunque el resto de las bandas no guardaran ninguna similitud. Los patrones de amplificación de *A. castellanii* no son repetitivos y las cepas de *A. polyphaga*, aunque no presentan un patrón de bandas repetitivo, comparten una banda de amplificación a la altura de 2500 pb (Figura 18-B; Tabla 8).

5.2.3.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-18.

Con el empleo de este cebador, las cepas ensayadas presentan un patrón de amplificación común, que se caracteriza por la presencia de una única banda de amplificación a la altura de 600 pb (Figura 19-A; Tabla 8).

5.2.4.- Patrones obtenidos con el cebador OPC-20.

Las cepas de *A. polyphaga* presentan un patrón de amplificación idéntico donde aparecían unas bandas de mayor intensidad de 1600, 1000, 800, 450 y 300 pb, respectivamente, y donde además, existe similitud en otras de menor intensidad que se encuentran a 1400, 1300, 1150, 700 y 550 pb. Las cepas de *A. astronyxis* presentan dos bandas de amplificación características de 680 y 600 pb, respectivamente. Además, la cepa 30137 presenta un serie de bandas de amplificación adicionales de 1000, 850, 400 y 300 pb. En las cepas de *A. castellanii* y *A. divionensis*, no se observa un patrón de bandas característico que nos permita caracterizarlas (Figura 19-B; Tabla 8).

5.2.5.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-1.

En el producto de amplificación obtenido con este cebador, las cepas de *A. divionensis* presentan un patrón repetitivo con un grupo de bandas comunes de mayor intensidad a la altura de 850, 950 y 1100 pb y otra, de menor tamaño e intensidad, a 700 pb; la cepa 50238 de *A. divionensis* amplificó una banda adicional a la altura de 600 pb. Las cepas de *A. astronyxis* presentan tres bandas comunes de 820, 780 y 480 pb, además de otras que no tienen ninguna similitud entre las cepas. Las cepas de *A. castellanii* y de *A. polyphaga*, no presentan ningún patrón característico (Figura 20-A; Tabla 9).

5.2.6.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-3.

Con este cebador, no se consiguió ningún patrón de amplificación característico que nos permita establecer unos criterios de diferenciación entre las cepas estudiadas (Figura 20-B; Tabla 9).

5.2.7.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-6.

En este caso, al igual que con el cebador OPD-3, no se estableció ningún patrón de amplificación característico que nos permita diferenciar entre las cepas del estudio (Figura 21-A; Tabla 9).

5.2.8.- Patrones obtenidos con el cebador OPD-19.

El producto de amplificación obtenido con este cebador, muestra una serie de bandas de amplificación donde las cepas de *A. divionensis* presentan un patrón de amplificación característico con una serie de bandas comunes a 2100, 1900, 1200 y 900 pb, respectivamente. En el caso de las cepas de *A. astronyxis*, aunque comparten una banda a la altura de 2300 pb, en el resto de sus amplificados no hay bandas comunes. Los patrones de amplificación de las cepas de *A. castellanii* y *A. polyphaga* no se mantienen constantes (Figura 21-B; Tabla 9).

5.3.- Resultados de los patrones obtenidos con las amplificaciones con los diferentes cebadores RAPD.

En las amplificaciones obtenidas con los diferentes cebadores podemos observar que, si por un lado no se encontró un único cebador RAPD que sirviese para identificar y

diferenciar a todas las especies, si comprobamos que con algunos de ellos se obtenían bandas de amplificación comunes entre las cepas de determinadas especies, tal como sucedió con la especie *A. divionensis* y los cebadores OPC-14, OPC-15, OPD-19, con la especie *A. astronyxis* y los cebadores OPC-14, OPC-20 y OPD-1 y con la especie *A. polyphaga* y el cebador OPC-20. Con las cepas de *A. castellanii* empleadas y con los cebadores RAPD ensayados no se observó ningún patrón de amplificación común entre ellas.

Los resultados obtenidos con el conjunto de los cebadores RAPD nos revelan una enorme variabilidad dentro de las cepas de *Acanthamoeba* estudiadas. Ésta ya había sido descrita anteriormente en trabajos realizados con RFLP con ADN genómico para dilucidar las relaciones intragénicas y probar la exactitud del esquema de clasificación morfológica de *Acanthamoeba*, que habían demostrado que diversos subgrupos no coincidían con las clasificaciones designadas hasta la fecha. Con estos análisis se detectó una enorme variedad, dentro de las distintas cepas de las especies de *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 1983, Daggett y col., 1985; Costas & Griffiths, 1986). Estos análisis, no solo mostraron una gran divergencia entre especies relacionadas sino que, también, se detectaron coincidencias entre acanthamoebas de grupos diferentes (Moura y col., 1992).

Estudios realizados con RFLP para el ADN mitocondrial (mtRFLP) probaron la existencia de un amplio grado de diversidad entre las cepas de los grupos II y III, especialmente, entre las especies *A. castellanii* y *A. polyphaga* (Yagita & Endo, 1990). Esta diversidad también se puso de manifiesto mediante el estudio realizado por Stothard y colaboradores en 1998, donde se combinaron los resultados de Yagita y Endo, con un estudio de homología de secuencias de los genes del ARN ribosómico 18S (Rns), encontrando que el grupo morfológico I tenía tanta divergencia que, probablemente, representa a uno o más géneros. Esta variabilidad se intentó justificar mediante una búsqueda de alelos múltiples, que apoyasen la heterogeneidad existente entre las especies de este grupo. Y comprobaron que, aunque existe un gran número de copias de los genes del Rns (Byers, 1986; Byers y col., 1990) en cada una de las cepas que se estudió, sólo se encontró un

alelo. Ello indicaba que, si hubiera varios alelos, existiría uno predominante sobre los otros y que este sería el que normalmente se estuviese amplificando en la secuenciación y sería el que se estuviese identificando (Stothard y col., 1998). Este podría ser uno de los problemas que se presentan, a la hora de la construcción de los árboles filogenéticos, ya que no se puede determinar qué alelos predominantes de las diferentes amebas son homólogos (Alves y col., 2000).

En la actualidad, se han realizando estudios filogenéticos basados en el análisis mediante PCR-RFLP del gen de la subunidad pequeña mitocondrial del ARN ribosomal, que ofrece la ventaja de no presentar intrones que puedan distorsionar los análisis filogenéticos. Se plantea que, dentro del grupo morfológico II, algunas cepas, como la cepa Chang de *A. castellanii*, presenta el mismo patrón que la cepa BH-2, que es la cepa tipo de *A. hatchetti*; que las cepas de *A. divionensis* AA-1 y AA-2, clasificadas morfológicamente por sus descubridores, Pussard & Ponds en 1977, como cepas distintas, presentan idénticos patrones con todas las enzimas empleadas, además de mostrar gran similitud con *A. quina* y *A. castellanii* Ma; y que, en el caso de las especies *A. astronyxis* y *A. tubiashi*, se observó que presentaban cierta divergencia con respecto al resto de las especies estudiadas. Todo ello podría ser debido a diferencias en la tasa de evolución entre genes nucleares y mitocondriales (Yu y col., 1999). De ahí que, las especies *A. divionensis* y *A. astronyxis*, presentasen patrones repetitivos y característicos con un mayor número de cebadores RAPD.

5.4.- Purificación de los productos amplificados mediante RAPD de las distintas especies de *Acanthamoeba*.

Se seleccionaron los productos amplificados de *Acanthamoeba* característicos para *A. divionensis* obtenidos con el cebador OPC-14 y de *A. astronyxis* y *A. polyphaga* obtenidos con el cebador OPC-20, debido a que presentaban fragmentos de amplificación entre 400 y

1000 pb, tamaño idóneo para ser secuenciados completamente, dadas las disponibilidades técnicas de nuestro laboratorio.

Los amplificadores fueron purificados directamente de la mezcla de reacción de PCR empleando el *High Pure PCR Product Purification Kit*. Éstos se ligaron en el vector de clonaje p-GEM-T Easy, para la posterior transformación de cepas de *E. coli* competentes. Se descartó la purificación a partir de geles de agarosa, debido a que con este método no se asegura el aislamiento individualizado de cada una de las bandas.

5.5.- Análisis de los tamaños de los fragmentos clonados.

Para conocer el tamaño de los insertos introducidos en el vector, éste se amplificó utilizando los cebadores presentes en el plásmido, el M13-40-Forward y el M 13-Reverse, que flanquean al lugar de inserción, empleando directamente las colonias de *E. coli* como ADN molde. (Comes y col. 1997).

5.5.1.- Análisis de los fragmentos clonados de la cepa 50238 de *A. divionensis*.

El amplificado de la cepa de *A. divionensis* 50238, obtenido con el cebador OPC-14, fue el elegido para su purificación e inserción en el vector y posterior transformación en el interior de bacterias *E. coli* competentes. En este caso, se obtuvieron seis clones y tras amplificar las colonias aisladas con los cebadores del plásmido, se observó que cinco de ellas presentaron inserto, aparentemente del mismo tamaño, a la altura de 580 pb y que la colonia restante amplificaba una banda a la altura de 220 pb al no poseer ningún inserto en su interior (Figura N° 22).

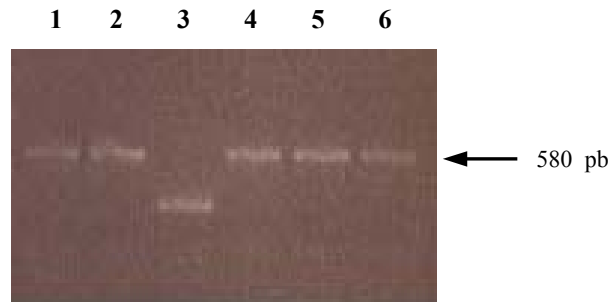


Figura 22: Amplificación los fragmentos de *A. divionensis* insertados en el vector de clonaje pGEM-T. 1 Clon AD-1 580 pb, 2 Clon AD-2 580 pb, 3 Clon AD-3 sin inserto. 4 Clon AD-4 580 pb, 5 Clon AD-5 580 pb, 6 Clon AD-6 580 pb.

5.5.2.- Análisis de los fragmentos clonados de la cepa 30901 de *A. astronyxis*.

Se seleccionó el amplificado de la cepa 30901, obtenido con el cebador OPC-20, para su inserción en el vector. Se eligió esta cepa y no la 30137 por visualizarse en la electroforesis del amplificado menor cantidad de bandas acompañando a las dos bandas consideradas como características de la especie (Figura 19-B). Se obtuvieron clones de dos tamaños distintos, cuatro a la altura de 700 pb y uno a la de 830 pb (Figura 23).

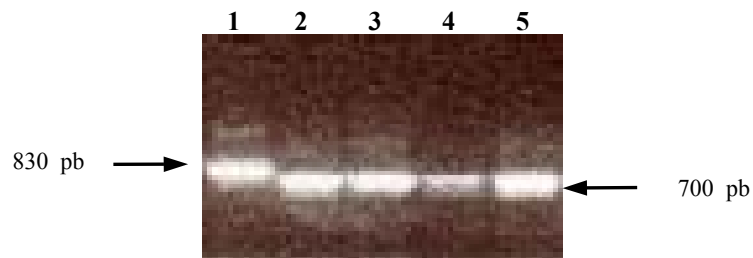


Figura 23: Amplificación los fragmentos de *A. astronyxis* insertados en el vector de clonaje pGEM-T. 1 Clon AA-1 830 pb, 2 Clon AA-2 700 pb, 3 Clon AA-3 700 pb, 4 Clon AA-4 700 pb, 5 Clon AA-5 700 pb.

5.5.3.- Análisis de los fragmentos clonados de la cepa 30461 de *A. polyphaga*.

El amplificado de la cepa 30461 de *A. polyphaga* obtenido con el cebador OPC-20 fue el elegido para su purificación e inserción en el vector y posterior transformación en el interior de *E. coli* competentes. En este caso, se obtuvieron siete clones y tras amplificar las colonias aisladas con los cebadores del plásmido se observó que, tres de ellas tenían un tamaño de 750 pb, otras tres 830 pb y una de 1150 pb aproximadamente (Figura 24).

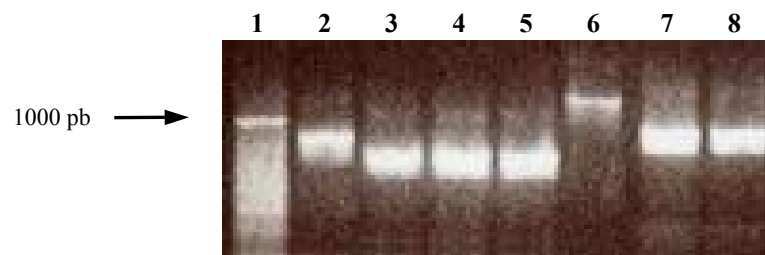


Figura 24: Amplificación los fragmentos de *A. polyphaga* insertados en el vector pGEM-T. **1** Patrón de peso molecular 100 pb, **2** Clon AP-1 830 pb, **3** Clon AP-2 750 pb, **4** Clon AP-3 750 pb, **5** Clon AP-4 750 pb, **6** Clon AP-5 1150 pb, **7** Clon AP-6 830 pb, **8** Clon AP-7 830 pb.

Los tamaños de los fragmentos clonados se observan en la Tabla 11:

Especie (cebador)	Fragmento	Tamaño aproximado Pb
<i>A. astronyxis</i> (OPC-20)	AA-1	830
	AA-2	700
	AA-3	700
	AA-4	700
	AA-5	700
<i>A. divionensis</i> (OPC-14)	AD-1	580
	AD-2	580
	AD-3	220
	AD-4	580
	AD-5	580
	AD-6	580
<i>A. polyphaga</i> (OPC-20)	AP-1	830
	AP-2	750
	AP-3	750
	AP-4	750
	AP-5	1150
	AP-6	830
	AP-7	830

Tabla 10: Tamaño de los fragmentos clonados de los productos amplificados con los cebadores OPC 20 y OPC 14.

5.6.- Secuenciación de los fragmentos clonados.

Para la secuenciación se seleccionaron los siguientes clones AA-1, AA-2 y AA-3 de *A. astronyxis*, AD-1, AD-2 y AD-4 de *A. divionensis* y AP-1, AP-2, AP-3, AP-5 y AP-7 de *A. polyphaga*.

Los clones transformados fueron crecidos en medio LB líquido durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se extrajo el ADN plasmídico empleando el *Quantum Prep Plasmid Miniprep* (Apartado 4.3.2) (Figura 25).

Para la secuenciación se emplearon los cebadores que flanquean la zona de inserción del plásmido M-13 Reverse y M-13-40 Forward, que se sitúan a 106 y 111 nucleótidos de ésta respectivamente, obteniéndose las secuencias mostradas en el ANEXO I.

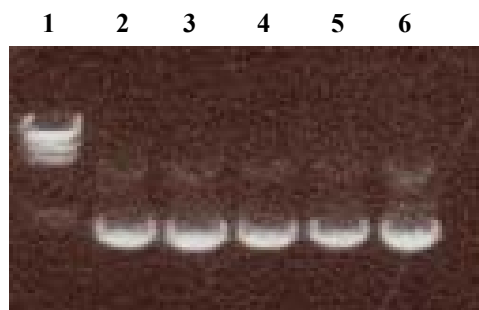


Figura 25: Plásmidos extraídos de las colonias seleccionadas, 1 Patrón de peso molecular, 2, 3, 4, 5, 6 Plásmidos con los insertos que se secuenciaron.

5.7.- Análisis de las secuencias de los fragmentos seleccionados.

Una vez secuenciados los fragmentos de *A. astronyxis* seleccionados, se observó que el clon AA-1 presentaba un tamaño de 613 pb y los clones AA-2 y AA-3 de 489 pb, siendo la secuencia de estos dos últimos fragmentos idéntica (Anexo I).

En el caso de los fragmentos clonados de *A. divionensis*, donde se había observado que presentaban todos el mismo tamaño, tras su secuenciación se comprobó que poseían todos la misma secuencia de bases, resultando ser un fragmento de 370 pb (Anexo I).

Del análisis de los clones de *A. polyphaga* AP-1 y AP-7 se observó que los fragmentos insertados presentaban la misma secuencia, con un tamaño de 618 pb (Anexo I). Los fragmentos de los clones denominados AP-2 y AP-3, tenían secuencias homólogas, con un tamaño de 530 pb. Mientras que el clon AP-5 presentaba un fragmento de 962 pb (Anexo I).

Especie	Fragmento	Tamaño real Pb
<i>A. astronyxis</i>	AA-1	613
	AA-2	489
	AA-3	489
<i>A. divionensis</i>	AD-1	370
	AD-2	370
	AD-4	370
<i>A. polyphaga</i>	AP-1	618
	AP-2	530
	AP-3	530
	AP-5	962
	AP-7	618

Tabla 11: Tamaño real de los fragmentos insertados en el plásmido p-GEM-T.

Todas estas secuencias de nucleótidos obtenidas, de los distintos fragmentos clonados, fueron estudiadas mediante un análisis FASTA y BLASTA, no habiéndose encontrado homología con ninguna de las secuencias depositadas en la base de datos Gene-Bank.

5.8.- Estudio de especificidad de los fragmentos aislados.

Para conocer la especificidad de las fragmentos aislados y a qué bandas de los amplificadores obtenidos mediante RAPD, se correspondían, se elaboraron sondas marcadas con digoxigenina a partir de cada uno de ellos. El método empleado para la elaboración de las sondas consistió en amplificar los clones seleccionados con los cebadores internos del plásmido, M-13 Forward y M-13-14 Reverse. Los productos se aislaron a partir de geles de bajo punto de fusión tras su separación electroforética. Para el marcaje de las sondas se empleó la actividad polimerasa de la enzima *Klenow* (Apartado 4.9.2). La especificidad de los fragmentos seleccionados y su presencia en alguna parte del genoma de las especies estudiadas se analizó mediante un *dot-blot*, enfrentando las sondas elaboradas con el ADN genómico de las especies a estudio (Apartado 4.8.2). Para comprobar con qué bandas del

amplificado se correspondían los fragmentos aislados, se realizó un *southern-blot*, enfrentando la sonda con el amplificado RAPD correspondiente (Apartado 4.8.1).

5.8.1- Estudio de especificidad de los fragmentos aislados a partir del amplificado de *A. divionensis* con el cebador OPC-14.

Se elaboró una sonda con el fragmento aislado en el clon AD-1. En el resultado de este ensayo se observó que este fragmento sólo híbrida con el ADN de *A. divionensis* (Figura 26).

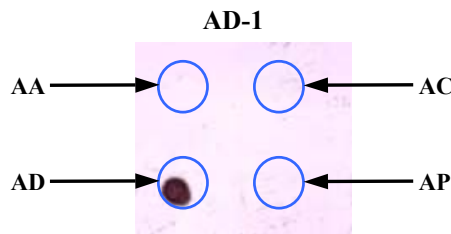


Figura 26: Hibridación mediante *dot-blot* con la sonda AD-1, de 370 pb con el ADN genómico de: **AA** *A. astronyxis* (30137), **AC** *A. castellanii* (30010), **AD** *A. divionensis* (50238), **AP** *A. polyphaga* (30461).

Tras la realización de *southern-blot*, se comprobó que el fragmento se correspondía con la banda amplificada a la altura de 400 pb y además que no se producía hibridación con el resto del amplificado. En este experimento aparecieron otras bandas de hibridación de menor tamaño e intensidad, posiblemente originadas por el fraccionamiento del fragmento amplificado (Quiros y col., 1995; Alonso, 1999).

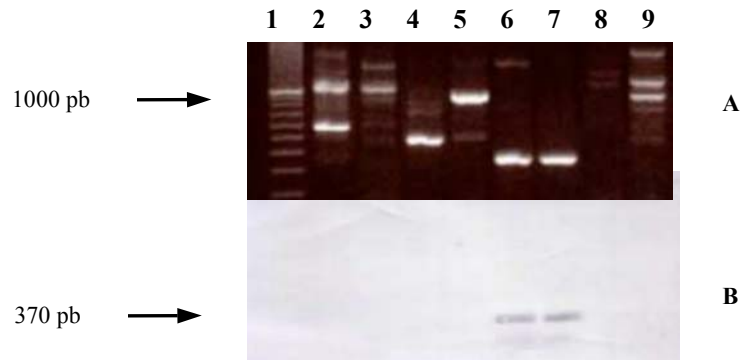


Figura 27:

A) Amplificados de las especies de a estudio de *Acanthamoeba* con el cebador OPC-14.

B) Shouthern-Blot de los amplificadros de las distintas especies de *Acanthamoeba* con el cebador OPC-14 y la sonda diseñada con el fragmento clonado de *A. divionensis* AD-1.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. astronyxis* (30901), **4** *A. castellanii* (30010), **5** *A. castellanii* (50492), **6** *A. divionensis* (50238), **7** *A. divionensis* (50251), **8** *A. polyphaga* (30461), **9** *A. polyphaga* (50495).

5.8.2.- Estudio de especificidad de los fragmentos aislados a partir del amplificado de *A. astronyxis* con el cebador OPC-20.

Al igual que en el caso anterior, se realizaron sendas sondas a partir de los fragmentos incluidos en los clones AA-1 y AA-2. Tras realizar el *dot-blot*, se observó que ambos fragmentos eran específicos, y que la sonda elaborada a partir del clon AA-2 presentaba una señal de hibridación más intensa que la que presentaba la elaborada a partir del clon AA-1, probablemente debido que ésta se encuentre más veces repetida en el genoma (Figura 28).

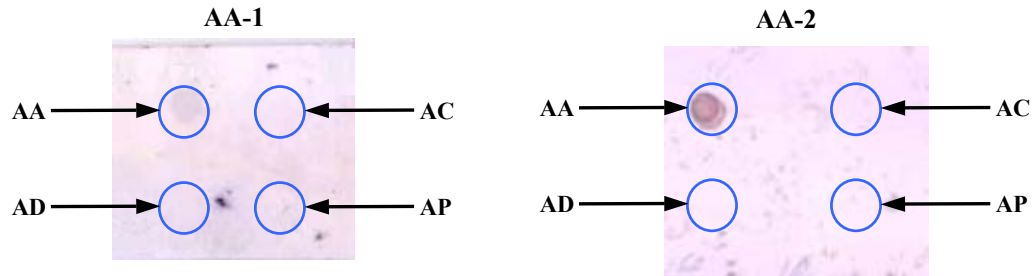


Figura 28: Hibridación mediante *dot-blot* de las sondas AA-1 y AA-2 de *A. astronyxis* con ADN genómico de distintas especies: **AA** *A. astronyxis* (30137), **AC** *A. castellanii* (30010), **AD** *A. divionensis* (50238), **AP** *A. polyphaga* (30461).

Se seleccionó la sonda del clon AA-2 para realizar el *southern-blot*, que coincidía con el fragmento amplificado de 600 pb de *A. astronyxis* (Figura 29).

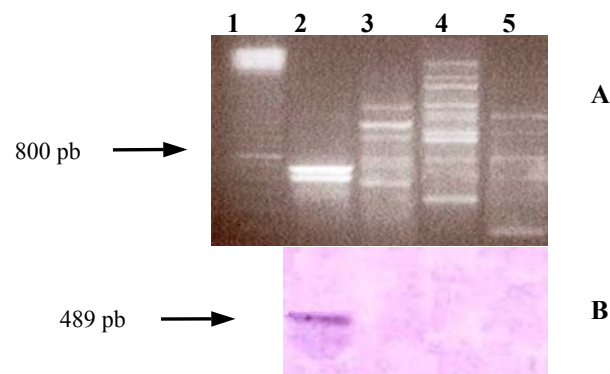


Figura 29:

A) Amplificación con el cebador OPC-20.

B) Hibridación con la sonda elaborada con el fragmento de 489 pb de *A. astronyxis* del clon AA-2.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. castellanii* (50492), **4** *A. polyphaga* (30461), **5** *A. divionensis* (50238).

5.8.3.- Estudio de especificidad de los fragmentos aislados a partir del amplificado de *A. polyphaga* con el cebador OPC-20.

Las sondas se elaboraron a partir de los clones AP-1, AP-3 y AP-5. Una vez realizado el *dot-blot*, se comprobó que la AP-1, no presentó ninguna señal de hibridación. Las otras dos sí presentaron hibridación específica con *A. polyphaga*, siendo la intensidad de la señal de hibridación de la sonda AP-5 mayor que la de AP-3, probablemente, al igual que en el caso anterior, por encontrarse más veces repetida su secuencia en el genoma (Figura 30).

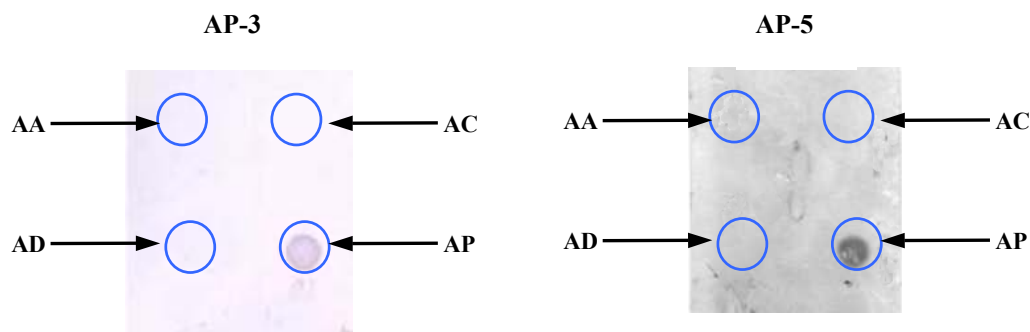


Figura 30: Hibridación mediante *dot-Blot* de las sondas elaboradas a partir de los clones AP-3 y AP-5 con ADN genómico de distintas especies: **AA** *A. astronyxis* (30137), **AC** *A. castellanii* (30010), **AD** *A. divionensis* (50238), **AP** *A. polyphaga* (30461).

Fue seleccionada la sonda del clon AP-5, que contenía un fragmento de 962 pb. Tras realizar el *southern-blot*, se comprobó que coincidía con la banda amplificada de *A. polyphaga* que aparecía a la altura de 1000 pb (Figura 31).

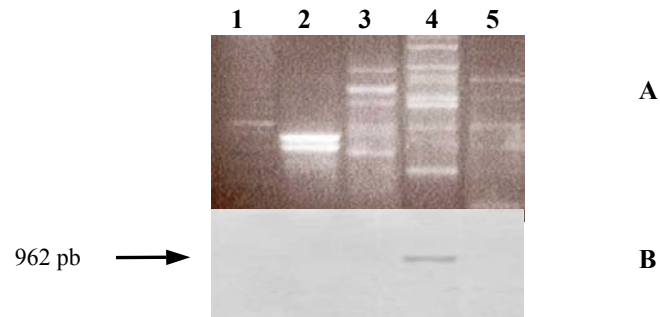


Figura 31:

A) Amplificación con el cebador OPC-20.

B) Hibridación con la sonda elaborada a partir del clon AP-5 de *A. polyphaga*.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. castellanii* (50492), **4** *A. polyphaga* (30461), **5** *A. divionensis* (50238).

5.9.- Diseño de cebadores a partir de los fragmentos seleccionados.

Conocida la secuencia y la especificidad de los fragmentos, se diseñaron, a partir de ellos, cebadores que nos permitiesen amplificar las especies de *Acanthamoeba* estudiadas. Se empleó las opciones que nos ofrecía el programa informático Gene-Runner 3.05, donde se tuvo en cuenta la longitud, porcentaje de Guaninas y Citosinas, temperatura de anillamiento de las parejas de cebadores a utilizar, además del grado de complementariedad entre ellos (Apartado 4.15).

Para conocer la especificidad de los cebadores se amplificó ADN de diferentes especies de *Acanthamoeba*: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. polyphaga* y *A. griffini* y se hibridó con cada una de las sondas (Apartado 4.8.1). Además se utilizó ADN humano en los experimentos, comprobando que éste nunca interfirió en los resultados.

5.9.1.- Diseño de cebadores para *A. astronyxis*.

A partir del fragmento insertado en el clon AA-2, que contiene el fragmento de 489 pb (Figura 33), se diseñó una pareja de cebadores que amplifica un fragmento de 425 pb (Figura 32), que es específico para *A. astronyxis*. La secuencia de los cebadores diseñados fue:

AA-2-Forward: 5' - CACTTGCCGAGAATAAAT - 3'

AA-2-Reverse: 5' - GTCTTACTACACAGGGCTTC - 3'

La temperatura de anillamiento teórica de los cebadores diseñados fue de 56° C para el AA-2-Forward y de 60° C para el AA-2-Reverse. Para ajustar las condiciones de anillamiento se probó las temperaturas de 35, 40, 45, 50, 55 y 60° C, obteniendo los mejores resultados a la temperatura de 45° C.

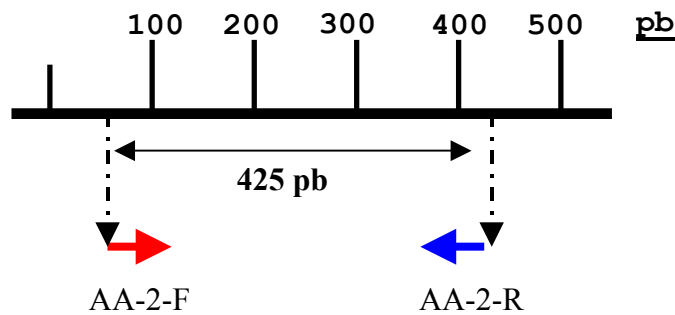


Figura 32: Esquema del diseño de los oligonucleótidos empleados.

```

ACTTCGCCACAAATGTCTGGAAATTCCATGTGATCTTTCACACTTGCCGAG 50
AATAAATTGGTAATTGGTAATTKKGCCTTCTGTCAAATGTATCTGTGGCG 100
→
TGAGAAAGAGAACAGAGAGAGAGAGATGAACAATTGTCATCAGTGTTAGC 150
AGCTTCTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGAGAGA 200
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTGTAGAAATGTGCCACATACTTGGGGCG 250
CGTKTCTCCATCATATTTGTACTCGCACAGAATTCCGTATTTCCAAATC 300
TTTTTCATTGCCTCTTCCACAACCTCTGCAAGGTTGTGAGAGCATAGGCTT 350
CACTGGGGTCCCTGTCTCCAGCAACTCATCATTTTTTTATCCGGCTTCTT 400
ATGCATAGGGGAATAAAGGGGCACGGAATGTAGGGTGGCACAGAAGCCCT 450
←
GTGTAGTAAGACTTTGATATTCCGTGGTGGCGAAGT 485
    
```

Figura 33: Secuencia del fragmento de *A. astronyxis* de 485 pb. En rojo la secuencia del cebador AA-2-Forward y en azul la secuencia complementaria del cebador AA-2-Reverse. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

Al amplificar con las especies de *Acanthamoeba*, se observó que sólo aparecía una banda del tamaño esperado, de 425 pb, con *A. astronyxis*. Al hibridar, con su sonda, se comprobó la especificidad del amplificado (Figura 34).

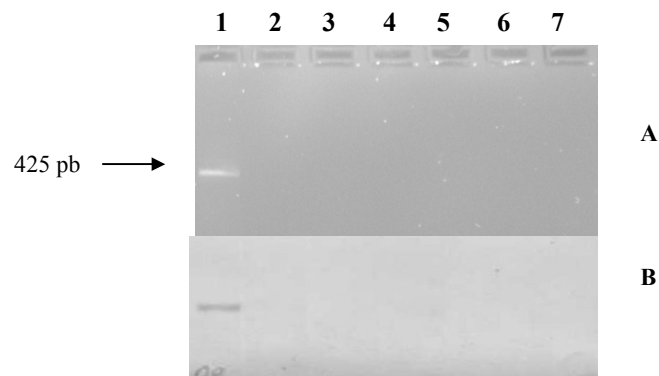


Figura 34:

A) Amplificación con la pareja de cebadores AA-2 de ADN de diferentes especies de *Acanthamoeba*.

B) Hibridación con su sonda específica.

1 *A. astronyxis* (30137), 2 *A. castellanii* (30010), 3 *A. divionensis* (50238), 4 *A. polyphaga* (30461), 5 *A. palestinensis*, 6 *A. griffini*, 7 ADN humano.

5.9.2.- Diseño de cebadores para *A. divionensis*.

Conocida la secuencia y especificidad del fragmento de 370 pb insertado en el clon AD-1 (Figura N° 36), se diseñó una pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 314 pb específico para *A. divionensis* (Figura 35). La secuencia de los cebadores diseñados fue:

AD-1-Forward: 5' - ACCTTCGGGCTCAACTC- 3'

AD-1-Reverse: 5' - AGAAGAGGACGAGCAGTGG- 3'

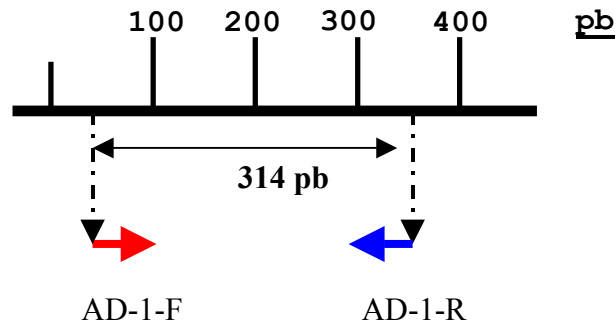


Figura 35: Esquema del diseño de los oligonucleótidos empleados.

La temperatura de anillamiento teórica de cada uno de los cebadores diseñados fue de 54° C, para el AD-1-Forward, y de 60° C, para el AD-1-Reverse. Para ajustar las condiciones de anillamiento se probaron las temperaturas de 55, 60, 65 y 72° C, obteniendo los mejores resultados a la temperatura de 60° C.

```

TGCGTGCTTGCCCAATTC CCTTTTGAGGGACCCATGTCAGCTGACCGACC 50
TTCGGGCTCAACTCAGGTTCCAGCTGGGCGGAACCGGTCCCTCCTCCCGG 100
TCACCATGCTCCCCG GATTCGGCGGCATTTCTCTGCGCGGACATCCCCGA 150
CCAGATCAAGAACGGCTACTTTCTGTCTTCTCGGGTACGATCGTACACTT 200
CTTCTTCTCCTCCTGCGTGTGTCGTTCTCATCATTGAAAGAGACCCAAA 250
AGAGACAAAAMGAACACGCGCCACGCCGACGAGTATCAACACAACCACAT 300
CATCACGGGCGGTGTACGTTCTCGTCAACTTCGGCCTCAACA TCTTCATCC 350
TGCTCGTCACCAAGCACGCA 370

```

Figura 36: secuencia del fragmento de *A. divionensis* de 370 pb. En rojo la secuencia del fragmento AD-1-Forward y en azul la secuencia complementaria del cebador AD-1-Reverse. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-14 empleado en la amplificación RAPD.

En el amplificado se observó que sólo aparecía una banda del tamaño esperado, de 314 pb con *A. divionensis*, cuya especificidad se verificó tras hibridar con la banda específica (Figura 37).

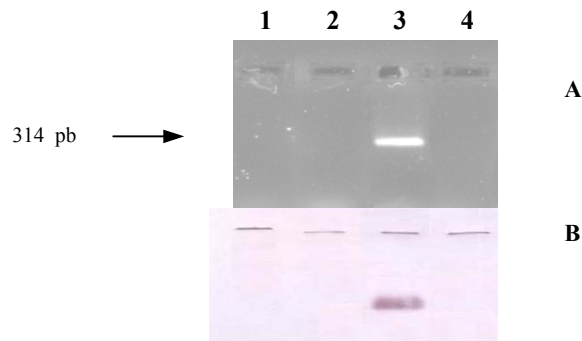


Figura 37:

A) Amplificación con la pareja de cebadores AD-1 de ADN de diferentes especies de *Acanthamoeba*.

B) Hibridación con su sonda específica.

1 *A. astronyxis* (30137), **2** *A. castellanii* (30010), **3** *A. divionensis* (50238), **4** *A. polyphaga* (30461),

También se probó con las especies *A. palestinensis* y *A. griffini*, sin que amplificase ni hibridase.

5.9.3.- Diseño de cebadores para *A. polyphaga*.

A partir del clon AP-5 de 962 pb (Figura N° 38), una vez conocida su especificidad y a qué banda se correspondía de las obtenidas con el cebador OPC-20, se diseñó una pareja de cebadores que amplificaban un fragmento de 707 pb específico para *A. polyphaga* (Figura 39). La secuencia de los cebadores diseñados fue:

AP-5-Forward: 5'- ACCTTCGGGCTCAACTC- 3'

AP-5-Reverse: 5'- AGAAGAGGACGAGCAGTGG- 3'

```

ACTTCGCCACACAACATACACACCATGCGCTCCGTCCTGGCCCTCTTCGC 50
CCTCCTGGCCCTCGCTGCCGTGCCCCAGGCCCTCGCTCGTCCCGAGCTCGC 100
NNNGTCCTVVVCCTCCAAGATCCTCCTGCGGCCCGCCGCCGACCCCGAAT 150
GGTGCCCCACCTGCGTCTCCTTCATGGATCAGGTACCGCCCCGCCGCCCA 200
CCCTTTCATCTTCTTCCGGCCAACACGACAATTTTTGTTGATTGTCTT 250
TTCTGTGAATCTGTTGCGGTTGCCGGTCGCGTAGTCGATCGATCAGCTGC 300
TGAACATCATCGCCAACGGCGGCGTGTGGGTGGATGCAACACCCTGTGC 350
GGCTACCTGAACCAGCAGCTCGAGGAGGTCGTGTGCAACCTGCTCTGTGA 400
CTACGTCGGTCTCCAGGGCTTCATCAAGCTGGTCGACACCATCGACCCCG 450
ACAGYATCTACATCTGCGAGGAGCTCACCGTGTGCCCCATCAGCCGCAAC 500
GCCAGCGTCCTTCAAGCAGCTCACCGTGAGCCCCCTCGCGCGGCTCGCAGG 550
GCACCACCTTCTCGTGAGGCCCTCTCCCAGGTCAACAACACCATCGGCAC 600
CGGCGAGCTCGACGTCGTGCTCCTCCCCCTGACGGCTTCGCCATCGAGG 650
GCGGCACTCTGCTCGTCAACGTCAAGCCCGGCGTGTACGGCGCCAAGTTC 700
GAGGTCCAGACCCAGCCCTCCGAGCAGGAGCCCTTCTCGCCCGGCGGAGT 750
GACGATCGTCCAGGCCGCCGTGTGCGAGGGTACCTGCGGCTCGTCGCASC 800
CCTACACCAAGACCCTCACCAAGGCCAGACCTCGTTCTTCATCACCCAG 850
TAAGCGCAATAAAAACAGCAGCGTGTGTTGACGGGTGTGTCTTGCTCTSGG 900
GCACAGCTBTCTTGCGATTGGTCGTACGGTGAAATTTGATAGAACATGA 950
CCGTGGCGAAGT 962

```

Figura 38: En rojo la secuencia del cebador AP-5-Forward y en azul la secuencia complementaria del cebador AP-5-Reverse, que amplifican un fragmento de 707 pb. En amarillo la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

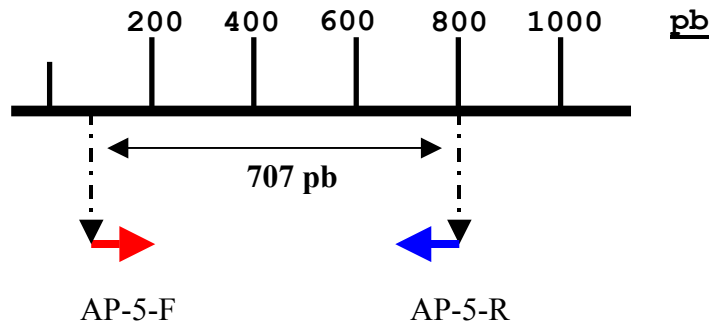


Figura 39: Esquema del diseño de los oligonucleótidos empleados

La temperatura de anillamiento teórica de los cebadores diseñados fue de 54° C para el AP-5-Forward y de 60° C para el AP-5-Reverse. Para ajustar las condiciones de anillamiento se probaron las temperaturas de 55, 60, 65 y 72° C, obteniendo los mejores resultados a la temperatura de 60° C.

Al igual que en los casos anteriores se utilizó esta pareja de cebadores para amplificar ADN de distintas especies de *Acanthamoeba*, observándose que solamente aparecía una banda de amplificación a la altura esperada, 707 pb, con la especie *A. polyphaga*, que se comprobó su especificidad con su sonda (Figura 40).

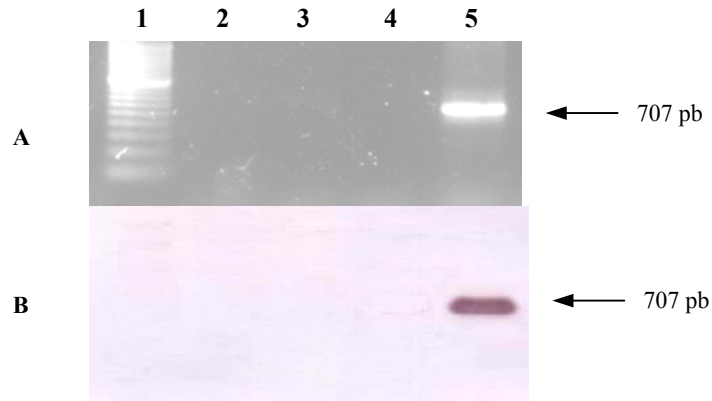


Figura 40:

A) Amplificación con la pareja de cebadores AP-5 de ADN de diferentes especies de *Acanthamoeba*.

B) Hibridación con sonda específica de *A. polyphaga*.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** *A. astronyxis* (30137), **3** *A. castellanii* (30010), **4** *A. divionensis* (50238), **5** *A. polyphaga* (30461),

También se probó con las especies *A. palestinensis* y *A. griffini*, sin que amplificase ni hibridase.

5.10.- Identificación de las distintas cepas.

Una vez diseñados los cebadores para la identificación de las especies de *Acanthamoeba*: *A. astronyxis*, *A. divionensis* y *A. polyphaga*, se comprobó su especificidad con las cepas patrón adquiridas del ATCC y CCAP y las cedidas por el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Edimburgo.

En la tabla 13 se resume en ensayo de especificidad de los cebadores diseñados.

Cepa	AA-2	AD-1	AP-5
<i>A. astronyxis</i> 30137 ¹⁾	+	-	-
<i>A. astronyxis</i> 30391 ¹⁾	+	-	-
<i>A. astronyxis</i> 1534-1 ²⁾	+	-	-
<i>A. castellanii</i> 30010 ¹⁾	-	-	-
<i>A. castellanii</i> 50492 ¹⁾	-	-	-
<i>A. castellanii</i> 50498 ¹⁾	-	-	+
<i>A. divionensis</i> 50238 ¹⁾	-	+	-
<i>A. divionensis</i> 50251 ¹⁾	-	+	-
<i>A. griffini</i> 1501-4 ²⁾	-	-	-
<i>A. mauritaniensis</i> ³⁾	-	-	-
<i>A. palestinensis</i> 1541-1 ²⁾	-	-	-
<i>A. palestinensis</i> ³⁾	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> 30461 ¹⁾	-	-	+
<i>A. polyphaga</i> 50495 ¹⁾	-	-	+
<i>A. polyphaga</i> 30899 ¹⁾	-	-	+
<i>A. polyphaga</i> 1501-18 ²⁾	-	-	+

Tabla 12: Cepas de *Acanthamoeba* procedentes del *American Type Culture Collection* (ATCC) ¹⁾, *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP) ²⁾, Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Edimburgo ³⁾.

El cebador AA-1, diseñado a partir del fragmento de *A. astronyxis* de 485 pb, es capaz de identificar a las cepas tipadas como *A. astronyxis*, amplificando únicamente con estas especies.

El cebador AD-1, diseñado a partir del fragmento de 370 pb de *A. divionensis*, amplifica las muestras correspondientes a *A. divionensis*.

El cebador AP-5, diseñado a partir del fragmento de 962 pb de *A. polyphaga*, amplificó las muestras tipadas como *A. polyphaga*, además de con la cepa ATCC-50498, que se corresponde con una especie de *A. castellanii*.

Tras observar este resultado, esta cepa de *A. castellanii*, fue remitida al Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Edimburgo, donde confirmaron que morfológicamente no presentaba características de *A. polyphaga*, pero que al igual que a nosotros, los patrones isoenzimáticos con los que trabajan para la caracterización de especies de *Acanthamoeba*, la situaban dentro del grupo de las *A. polyphaga*.

En un estudio de RFLP del ADN mitocondrial con cepas de *A. polyphaga*, que habían sido incluidas dentro de este grupo, aplicando los criterios morfológicos empleados por Pussard y Ponds en 1977, demostró que existía una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Sin embargo, determinadas cepas podrían no compartir las características morfológicas, por ello no estar incluidas dentro de este grupo y presentar un patrón de RFLP característico de *A. polyphaga* (Kong y col., 1995).

5.11.- Determinación específica de *Acanthamoeba*.

5.11.1.- Estudio de *Acanthamoeba* aisladas de estuches portales.

Se analizó el contenido de estuches portales. Se investigó un total de 37 portales de estudiantes de nuestra Facultad, que empleaban habitualmente lentes de contacto de periodicidad mensual. Ninguno de los individuos sometidos a estudio manifestó presentar algún tipo de afección ocular, en el momento de la toma de las muestras. El tiempo de uso de cada uno de los estuches estuvo comprendido entre 6 y 10 semanas.

Los estuches fueron lavados con solución salina estéril y se sembró el líquido de lavado en agar al 2%. En 11 de los portales ellos se aislaron amebas. Estas muestras se procesaron con los cebadores genéricos (Acan-1) y los específicos diseñados por nosotros

(AA-2, AD-1 y AP-5). De estos aislados, diez amplificaron con los cebadores genéricos, por tanto integrantes de género *Acanthamoeba*. De éstos, dos de ellos amplificaron con los cebadores AA-2, por lo que se trata de amebas de la especie *A. astronyxis* y un tercer aislado amplificó con los cebadores AP-5 de *A. polyphaga*. Por todo ello, se debe considerar que el resto de los aislados son de especies del género *Acanthamoeba* diferentes a las estudiadas.

Portales	Acan-1	AA-2	AD-1	AP-5
002	+	-	-	-
008	+	-	-	+
009	+	-	-	-
012	+	+	-	-
011	+	-	-	-
017	+	-	-	-
024	+	-	-	-
031	+	-	-	-
032	+	+	-	-
035	+	-	-	-

Tabla 13: Aislados de *Acanthamoeba* a partir de estuches portales.

Las lentes de contacto desechables de periodicidad mensual, son las que más se comercializan en la actualidad, debido a la comodidad en su uso, mayor higiene, por su corto periodo de vida útil, y su mínimo mantenimiento, ya que no precisan sistemas de desinfección. Es precisamente en los usuarios, de este tipo de lentes, donde se diagnostican un mayor número de casos de queratitis por *Acanthamoeba* (Morlet y col., 1997). Una de las probables vías de contaminación de las lentes, pueden ser sus estuches, debido a que el cambio mensual de las lentes no suele coincidir con la renovación del portales, que la no desinfectarse, va a provocar que, lentes recién estrenadas, puedan contaminarse desde los primeros días de uso y ser capaces de vehicular las amebas al ojo (Kilvington, 1999).

5.11.2.- Estudio de *Acanthamoeba* aisladas de muestras biológicas.

Los aislados obtenidos a partir de muestras biológicas procedían del Laboratorio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona y del Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza..

Aislados corneales	Acan-1	AA-2	AD-1	AP-5
Z-2	+	+	-	-
Z-3	+	-	-	-
Z-4	+	-	-	-
Z-5	+	-	-	-
Z-10	+	-	-	-
Z-11	-	-	-	-
Z-12	-	-	-	-
BCN-Y30GPS	+	-	-	-
BCN-1	+	-	-	-
BCN-3	-	-	-	-
BCN-4	+	-	-	+
BCN-5	+	-	-	+
BCN-6	-	-	-	-
BCN-8	-	-	-	-
BCN-9	-	-	-	-
Aislado pulmonar				
BCN-2	+	-	-	-
Aislado ganglio				
BCN-7	+	-	-	+

Tabla 14: Aislados de *Acanthamoeba*, procedentes del Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza (**Z**) y del Laboratorio de Microbiología del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona (**BCN**).

5.11.2.a.- Aislados a partir de córneas.

Estos aislados se obtuvieron de raspados corneales de pacientes, usuarios de lentes de contacto, que bien habían presentado úlceras corneales o se les había diagnosticado una queratitis. Los aislados se procesaron con los cebadores genéricos (Acan-1) y los específicos diseñados por nosotros (AA-2, AC-1 y AP-5) y se comprobó que 9 de ellos amplificaban con los cebadores genéricos, por lo que deducimos que estas amebas pertenecen al género *Acanthamoeba*. Éstos fueron los aislados Z-2, Z-3, Z-4, Z-5, Z-10, BCN-Y30GPS, BCN-1, BCN-4 y BCN-5.

El aislado Z-2 amplificó con la pareja de cebadores AA-2 por lo que se trata de una *A. astronyxis*.

Los aislados Z-3 y Z-10 pertenecían a un mismo paciente, las muestras fueron obtenidas antes y después de someterlo a tratamiento farmacológico. Se observó la presencia de amebas tras la terapia, comprobando que la ulceración no había remitido. Estas muestras no amplificaron con los cebadores específicos diseñados, por lo que no se pudo determinar la especie de *Acanthamoeba* de la que se trataba.

Los aislados BCN-4 y BCN-5 presentaron amplificación con la pareja de cebadores AP-5, por lo que estas amebas pertenecen a la especie *A. polyphaga*. Consultadas las historias clínicas de éstos dos últimos aislados, se comprobó que ambos pertenecían al mismo paciente, a cada uno de sus ojos, destacando que el paciente sólo había presentado ulceración en uno de ellos.

El ochenta y cinco por ciento de las queratitis por *Acanthamoeba* que se diagnostican se producen en portadores de lentes de contacto (Moore, 1988). La incidencia de esta patología se ha visto vertiginosamente aumentada en la última década, pasando de dos casos por millón, en usuarios de lentes de contacto, a un caso, cada diez mil. (Schaumberg y col., 1998; Radford y col., 1998). Esto se ha visto favorecido por las inadecuadas medidas higiénicas en el cuidado y mantenimiento de las lentes, como el empleo para la limpieza de

las lentes de soluciones salinas caseras, elaboradas con agua no estéril, además de describirse casos de contaminación por el baño con las lentes de contacto puestas en piscinas, bañeras o con mangueras de riego (Stehr-Green y col., 1987; Stehr-Green y col., 1989; Mathers y col., 1996).

La queratitis por *Acanthamoeba* suele producirse en un solo ojo, incluso cuando ambas lentes de contacto y ambas están contaminadas. Esto apoya la hipótesis de que pequeñas heridas o úlceras presentes en el epitelio corneal predisponen a la infección en un ojo y no en el otro (Larkin & Easty, 1990). Estudios experimentales en hámster han demostrado que la enfermedad corneal no se desarrolla, a no ser que se hubiera producido una herida o úlcera en el epitelio corneal, previa a la aplicación de lentes de contacto cubiertas de *Acanthamoeba* (Van Klink y col., 1993). Otros estudios, en modelos de rata, indicaron que una inyección intracorneal de *Acanthamoeba*, aislada de ojos humanos infectados, no producía queratitis, a no ser que hubiera una coinyección de bacterias de la propia flora del ojo, por lo que ciertos elementos van a actuar como cofactores en este proceso infeccioso (Badenoch y col., 1990). Aun así, observaciones *in vitro* con microscopía electrónica de barrido y de transmisión han mostrado que *A. castellanii* puede llegar a atravesar el epitelio de córneas humanas intactas, por lo que en algunos casos, puede que no sea preciso un traumatismo epitelial previo (Moore y col., 1991).

5.11.2.b.- Aislado a partir de biopsia pulmonar.

En el análisis realizado de las amebas aisladas de la necropsia bronquial del paciente BCN-2 (Anexo III), se comprobó, tras amplificar el ADN extraído con los distintos cebadores empleados en este trabajo, que este aislado se trataba con una ameba del género *Acanthamoeba*, pero que no se correspondía con alguna de las especies para las que habíamos diseñado cebadores específicos (Figura N° 41), descartando que se tratase de las especies *A. astronyxis*, *A. divionensis* y *A. polyphaga*.

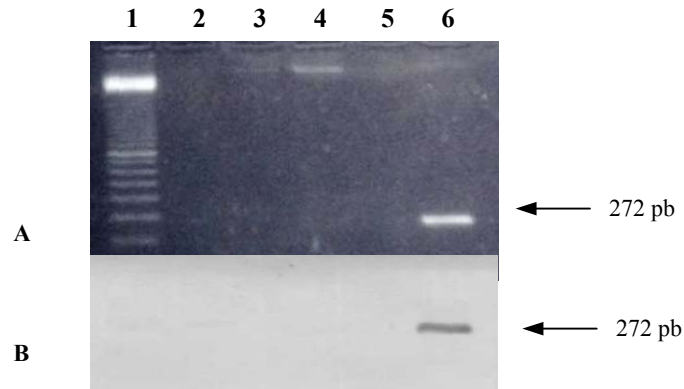


Figura 41:

A) Amplificación del ADN procedente del aislado de la muestra pulmonar con las pareja de cebadores AA-2, AD-1, AP-5 y Acan-1.

B) Hibridación con sonda específica de *Acanthamoeba* sp..

1 Patrón de peso molecular 100 pb, 2 Pociillo en blanco, 3 Pareja de cebadores AA-2, 4 Pareja de cebadores AD-1, 5 Pareja de cebadores AP-5, 6 Pareja de cebadores Acan-1.

El número de casos descritos en la bibliografía de acanthamebiasis diseminada no es muy elevado, siendo éste el tercer caso donde se hace referencia a una afección pulmonar por parte de *Acanthamoeba*. Como en los otros dos casos publicados, se trataba de un paciente que había sufrido un trasplante de pulmón y donde tras una serie de complicaciones había fallecido. En ninguno de los casos se ha atribuido directamente la causa de la muerte a la presencia de *Acanthamoeba*, pero lo que es cierto es que su presencia provoca necrosis de los tejidos que invade, lo que conlleva un deterioro importante en el estado de salud del paciente (Rosemberg y col, 2001; Steinberg y col, 2002).

5.11.2.c.- Aislado a partir de biopsia de ganglio.

En el análisis realizado de las amebas aisladas de la biopsia de ganglio mesentérico del paciente BCN-7, que se correspondía con un individuo inmunodeprimido que había sido diagnosticado de linfoma (Anexo III), se comprobó que presentaba una amplificación positiva con la pareja de cebadores AP-5, por lo que se identifica a estas amebas como integrantes de la especie *A. polyphaga* (Figura 42).

Este es el primer caso de acanthamebiasis diseminada donde se encuentra afectado un ganglio mesentérico. Además es la primera cita de la presencia de *A. polyphaga* en un ganglio (Marciano-Cabral, 2000; Shasuzzaman & Hashiguchi, 2002).

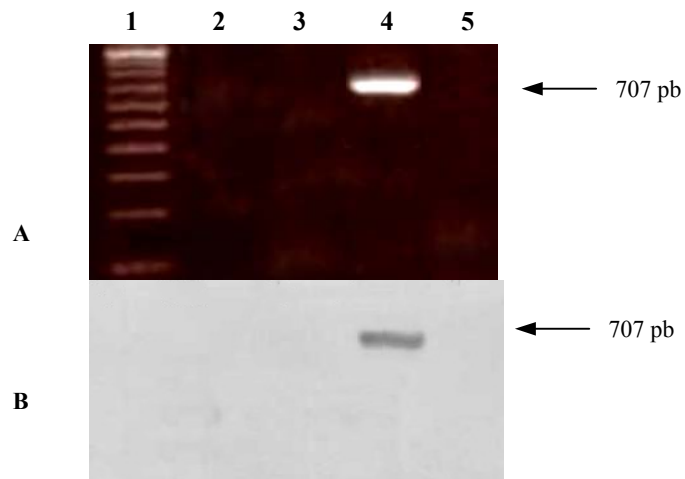


Figura 42:

A) Amplificación del ADN procedente del aislado de la muestra pulmonar con la pareja de cebadores AA-2, AD-1, AP-5.

B) Hibridación con sonda específica de *A. polyphaga*.

1 Patrón de peso molecular 100 pb, **2** Pareja de cebadores AA-2, **3** Pareja de cebadores AD-1, **4** Pareja de cebadores AP-5, **5** blanco.

5.11.3.- Estudio de *Acanthamoeba* en líquido cefalorraquídeo (LCR).

Se estudiaron 26 muestras de LCR de pacientes ingresados en el Servicio de Urgencias del Hospital de La Candelaria. Cada uno de los LCR con los que trabajamos se dividieron en dos alícuotas, una que era sembrada en agar al 2 % y la otra a la que se le realizaba directamente una extracción de ADN.

De los 26 LCR analizados por PCR, uno resultó ser positivo a *A. astronyxis* (Anexo II). La presencia de esta ameba se verificó posteriormente al crecer en las placas de cultivo e identificar por PCR a esta misma especie. Ningún otro de los LCR estudiados presentó amplificación positiva por PCR, con los cebadores empleados en el estudio, o presencia de amebas tras el cultivo (Figura 43).

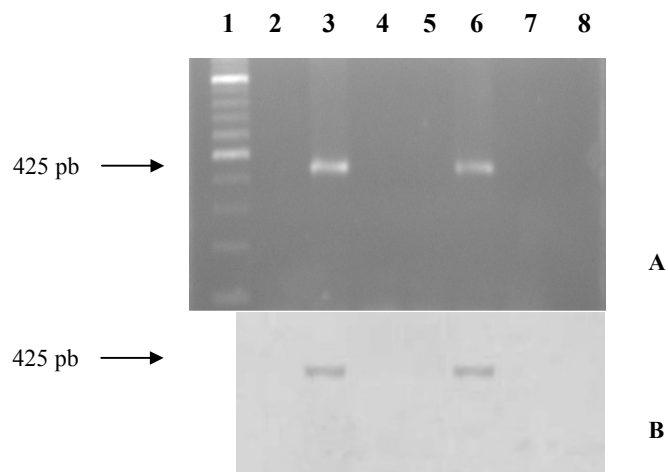


Figura 43:

A) Amplificación con la pareja de cebadores AA-2.

B) Hibridación con sonda específica.

1 Patrón de peso molecular de 100 pb **2** LCR-7 **3** LCR-19 **4** LCR-23 **5** LCR-26 **6** *A. astronyxis* (30137), **7** *A. castellanii* (30010), **8** Blanco.

El paciente al que correspondía éste LCR, se trataba de un varón de 11 años de edad, inmunocompetente, al que se le había diagnosticado una meningitis de líquido claro, como una probable enterovirus (Anexo III). Detectada la presencia de *A. astronyxis* en su LCR, el paciente fue llamado de nuevo a consulta y se le volvió a practicar una punción lumbar con el fin de repetir los análisis. Se analizó el LCR, de la misma forma anteriormente descrita, siendo en este caso tanto la PCR como el cultivo negativos.

Muestra	Ref. N°	Acan-1	AA-2	AD-1	AP-5	Cultivo
LCR 19	8837	+	+	-	-	+

Tabla 15: Líquido cefalorraquídeo del paciente del Hospital La Candelaria.

Este es el primer caso descrito en las Islas Canarias de identificación y aislamiento de *Acanthamoeba* en líquido cefalorraquídeo. Las causas de la colonización son completamente desconocidas. Los casos de Encefalitis Granulomatosa Amebiana debidos a especies de *Acanthamoeba* se han descrito normalmente en pacientes inmunodeprimidos, sin embargo algunos pacientes no tienen un factor predisponente claro (Ma y col., 1990, Rodríguez y col., 1998; Armstrong, 2000).

El diagnóstico en LCR es difícil debido a la rareza de la enfermedad, así como las técnicas agresivas que se han de llevar a cabo para la obtención de la muestra. Los cebadores específicos diseñados a partir de la técnica de RAPD han permitido el diagnóstico rápido de especies de *Acanthamoeba* en LCR, lo que es importante a la hora de establecer un diagnóstico y tratamiento efectivo.

Las infecciones diseminadas producidas por *Acanthamoeba* se caracterizan por la aparición de infiltrados granulomatosos en la piel, en diferentes órganos y en el cerebro, normalmente en pacientes inmunocomprometidos o pacientes terminales. Parecen estar transmitidas vía hematogena, probablemente desde un foco original de una infección previa

en la piel o en el tracto respiratorio. A partir de este punto, se disemina, originando múltiples lesiones, bien en la piel, lo que ocurre normalmente en los pacientes SIDA (González y col., 1986; Friedland y col., 1992; Helton y col., 1993), o bien involucrando a distintos órganos e incluso al Sistema Nervioso Central, pudiendo ser un paso previo al desarrollo de una Encefalitis Granulomatosa Amebiana (Ma y col., 1990). En la mayoría de los casos, los pacientes fallecen sin poder llegar a evaluar realmente el tratamiento aplicado para controlar la infección amebiana. Además, en el caso de las encefalitis, al no poderse determinar con precisión el tiempo de incubación, que puede oscilar de semanas a meses (Ma y col., 1990), es complicado poder llegar a controlar la infección (Ferrante, 1991-a).

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES.

- 1- La utilización de la técnica RAPD ha resultado válida para caracterizar las especies del género *Acanthamoeba*: *A. astronyxis*, *A. divionensis* y *A. polyphaga*.
- 2- Las cepas de *A. castellanii* incluidas en este estudio no han presentado un patrón repetitivo de amplificación.
- 3- Los cebadores AA-2, AD-1 y AP-5 diseñados a partir de las bandas características aisladas de los amplificadores RAPD, obtenidas con los cebadores OPC seleccionados, son útiles para la identificación de *A. astronyxis*, *A. divionensis* y *A. polyphaga* respectivamente.
- 4- El empleo de estos cebadores en muestras biológicas es eficaz para el diagnóstico de parasitosis producidas por estas amebas. Así como para estudios epidemiológicos relacionados con los hábitats donde se pueden encontrar estos organismos.
- 5- La aplicación de las técnicas empleadas en este trabajo en la cepa ATCC 50498 de *A. castellanii* pone en duda la consistencia de su encuadramiento específico.
- 6- Proponemos una revisión del género *Acanthamoeba* mediante la utilización de estudios filogenéticos que aclaren el estatus de cada una de las especies dentro del género y se establezcan las sinonimias oportunas.

ANEXOS

7.- ANEXOS.

7.1.- ANEXO I.

7.1.1.- Secuencia del fragmento de *A. divionensis* de 370 pb.

Secuencia del fragmento de *A. astronyxis* de 613 pb. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

TGCGTGCTTG	CCCAATTCCCTTTTGAGGGACCCATGTCAGCTGACCGACC	50
	TTCGGGCTCAACTCAGGTTCCAGCTGGGCGGAACCGGTCCCTCCTCCCGG	100
	TCACCATGCTCCCCGGATTTCGGCGGCATTCTCTGCGCGGACATCCCCGA	150
	CCAGATCAAGAACGGCTACTTTCTGTCTTCTCGGGTACGATCGTACTT	200
	CTTCTTCTCCTCCTGCGTGTGTCGTTCTCATCATTGAAAGAGACCCAAA	250
	AGAGACAAAAMGAACACGCGCCACGCCGACGAGTATCAACACAACCACAT	300
	CATCACGGGCGTGTACGTTCTCGTCAACTTCGGCCTCAACATCTTCATCC	350
	TGCTCGTCAC	370
	CAAGCACGCA	

7.1.2.- Secuencia del fragmento de *A. astronyxis* de 613 pb.

Secuencia del fragmento de *A. astronyxis* de 613 pb. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

```
ACTTCGCCAC AACGGGAATGGGAGGATTAGCCAACCTTCAGTGGTTGTTG 50
GAAGATGTCATCAAGCAAACTTAACAGGTGATTTTCATAGAGGCAGGAGT 100
GTCTAGGGGTGAAGCGTCACTGTTTTGCCAGTGCAGTCATGCGTACCTATG 150
GCCAACACATAGAAGGGTGTGGCTTGCCAGATACTTTTGCTGGATCTACAG 200
GTTTTGACTTCAAAGAGCTCCCCAGCTGATGCATCCAAATATGAGGCACA 250
TGCGCCTTCAAGAAGAAATCCMGGTTACCTGCTCTCAAGAAGCTCTTTAA 300
CAAAGTGGACATGCTCGATGATCAAGTGAAGTTCTTGAAGGGTTCCATCA 350
ACGATAGTATTCCTCCAACATGCGCCAGTTAACCTCTTTGCTGTTCTCA 400
AATTGGGCACTAGCTCGTACTCAAGCCCCGGGATTGCCTCACAACTCTC 450
TCTCGGCTACTATCAGAGGGTGGATATGTGATAGTGGATAACTATCTCGA 500
CAACGAGGAGTGCAGAAAGCCGTGGRTCATTTTCAGAGAAACACATTGGRT 550
CACTGAGCCTCTCATTCCAGTCTGGKCCAAGCAGGAGAGTTACCAGGAGT 600
CTG GTGGCGAAGT 613
```

7.1.4.- Secuencia del fragmento de *A. polyphaga* 530 pb.

Secuencia del fragmento de *A. polyphaga* de 530 pb. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

```
ACTTCGCCAC CAGACTCCCTGGATAACCTCTCCCTGCTTGGACCAGACTG 50
GAATGAGAGGCTCAGTGANCCAATGTGTTTCTCTGAAATGATCCATGGCC 100
TTTCTGCTACTCCTCGTTGTCGAGATAGATTATCCACTATCACATATCCA 150
CCCTCTGATAGTAGCCGAAAGAGAGTTGTGAGGCAATCCCTGGAGCTTGA 200
GTACGAGCTAGTGCCCAATTGAGAACAGCAAAAGAGTTAACTGGCGCATG 250
TTGGAGGGAATACTATCGTTGATGGAACCCYTCAAGAACTTCACTTGATC 300
ATCGAGCATGTCCACTTTGTTAAGAGCTTCTTGAGAGCAGGTAACCTGGA 350
TTTCTTCTGAAGGCGCATCTGYCTCATATTGGATGCATCAGCTGGGGAGC 400
TCTTGAAGTCAAAACCTGTAGATCCMGCAAAAGTATCTGCAAGCCACGGC 450
CTTCTATGATGTBGGCATAGGTACGCATGACTGCACTGGCAAACAGTGAC 500
GGTTCACCCCTAGACACTCCTGCCTCTATG 530
```

7.1.5.- Secuencia del fragmento de *A. polyphaga* 618 pb.

Secuencia del fragmento de *A. polyphaga* de 618 pb. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

```

ACTTCGCCAC CAGACTCCCTGGATAACCTCTCCCTGCTTGGACCAGACTG 50
GAATGAGAGGCTCAGTGABCCAATGTGTTTTCTCTGAAATGATCCATGGCC 100
TTTCTGCTACTCCTCGTTGTCGAGATAGATTATCCACTATCACATATCCA 150
CCCTCTGATAGTAGCCGAAAGAGAGTTGTGAGGCAATCCCTGGAGCTTGA 200
GTACGAGCTAGTGCCCAATTGAGAACAGCAAAAGAGGTTAACTGGCGCAT 250
GTTGGAGGGAATACTATCGTTGATGGAACCCTTCAAGAACTTCACTTGAT 300
CATCGAGCATGTCCACTTTGTTAAAGAGCTTCTTGAGAGCAGGTAACCTG 350
GATTTCTTCTGAAGGCGCATCTGCCTCATATTGGATGCATCAGCTGGGGA 400
GCTCTTGAAGTCAAACCTGTAGATCCAGCAAAAGTATCTGCAAGCCACG 450
GCCTTCTATGATGTTGGCAATAGGTACGCATGACTGCACTGGCAAACAGT 500
GACGCTTACCCCTAGACACTCCTGCCTCTATGAAATCACCTGTTAAGTT 550
TTGCTTGATGACATCTTCCAACAACCACTGAAGGTTGGCTAATCCTCCCA 600
TTCCCGTTGTGGCGAAGT 618

```

7.1.6.- Secuencia del fragmento de *A. polyphaga* 962 pb.

Secuencia del fragmento de *A. polyphaga* de 962 pb. En amarillo se observa la secuencia del cebador OPC-20 empleado en la amplificación RAPD.

```
ACTTCGCCACACAACATACACACCATGCGCTCCGTCCTGGCCCTCTTCGC 50
CCTCCTGGCCCTCGCTGCCGTCGCCAGGCCTCGCTCGTCCCAGCTCGC 100
NNNGTCTVVCCTCCAAGATCCTCCTGCGGCCCGCCGCGACCCCGAAT 150
GGTCCCCACCTGCGTCTCCTTCATGGATCAGGTACCGCCCGCCGGCCCA 200
CCCTTTCATCTTCTTCCGGCCAACTCACGACAATTTTTGTTGATTGTCTT 250
TTCTGTGAATCTGTTGCGGTTGCCGGTCGCGTAGTCGATCGATCAGCTGC 300
TGAACATCATCGCCAACGGCGGCGTGCTGGGTGGATGCAACACCCTGTGC 350
GGCTACCTGAACCAGCAGCTCGAGGAGTTCGTGTGCAACCTGCTCTGTGA 400
CTACGTCGGTCTCCAGGGCTTCATCAAGCTGGTCGACACCATCGACCCCG 450
ACAGYATCTACATCTGCGAGGAGCTCACCGTGTGCCCATCAGCCGCAAC 500
GCCAGCGTCCTTCAAGCAGCTCACCGTGAGCCCCTCGCGCGGCTCGCAGG 550
GCACCACCTTCTCGTGAGGCCCTCTCCCAGGTCAACAACACCATCGGCAC 600
CGGCGAGCTCGACGTCGTCGTCCTCCCCCTGACGGCTTCGCCATCGAGG 650
GCGGCACTCTGCTCGTCAACGTCAAGCCCGGCGGTACGGCGCCAAGTTC 700
GAGGTCCAGACCCAGCCCTCCGAGCAGGAGCCCTTCTCGCCCGGCGGAGT 750
GACGATCGTCCAGGCCGCCGTGTGCGAGGGTACCTGCGGCTCGTTCGCASC 800
CCTACACCAAGACCCTCACCAAGGCCAGACCTCGTTCTTCATCACCAG 850
TAAGCGCAATAAAACAGCAGCGTGTGTTGACGGGTGTGTCTTGCTCTSGG 900
GCACAGCTBTCTTGCATTTGGTCGTACGGTAAAATTTTCGATAGAACATGA 950
CCGTGGCGAAGT 962
```

7.2.- ANEXO II.

7.2.1.- Resultados de los líquidos cefalorraquídeos estudiados.

Muestra	Ref. N°	Acan	AA-2	AD-1	AP-5	Cultivo
LCR 1	4963	-	-	-	-	-
LCR 2	4624	-	-	-	-	-
LCR 3	4695	-	-	-	-	-
LCR 4	4743	-	-	-	-	-
LCR 5	4489	-	-	-	-	-
LCR 6	2584 – 11	-	-	-	-	-
LCR 7	4318	-	-	-	-	-
LCR 8	3214	-	-	-	-	-
LCR 9	4358	-	-	-	-	-
LCR 10	3519	-	-	-	-	-
LCR 11	3167	-	-	-	-	-
LCR 12	3779	-	-	-	-	-
LCR 13	4758	-	-	-	-	-
LCR 14	4017 – 55	-	-	-	-	-
LCR 15	4197	-	-	-	-	-
LCR 16	3906	-	-	-	-	-
LCR 17	8468	-	-	-	-	-
LCR 18	8587	-	-	-	-	-
LCR 19	8837	+	+	-	-	+
LCR 20	8834	-	-	-	-	-
LCR 21	8013	-	-	-	-	-
LCR 22	8014	-	-	-	-	-
LCR 23	7351	-	-	-	-	-
LCR 24	8235	-	-	-	-	-
LCR 25	7884	-	-	-	-	-
LCR 26	8140	-	-	-	-	-

7.3.- ANEXO III.

7.3.1.- Historia clínica del paciente BCN-2.

Paciente varón de 31 años que ingresó en el servicio de medicina intensiva del Hospital General del Vall d'Hebron, procedente del servicio de neumología por insuficiencia respiratoria aguda. Se le había practicado un trasplante bipulmonar, con evolución posterior correcta, con buen funcionalismo respiratorio. Pasados dos años se observaron complicaciones pulmonares como consecuencia del trasplante, presentando neumotórax, hemotórax, septicemia y bronconeumonía por enterococo, sangrado de vías aéreas superiores y diátesis hemorrágica. Falleciendo por fibrilación ventricular. En los estudio de las muestras pulmonares (bronquio) realizados durante la necropsia, el anatomopatólogo informó de la presencia de una fibrosis pulmonar extensa de predominio central, consistente, con base fibrótica de daño alveolar difuso asociada a focos múltiples de neumonía granulocitaria en todos los lóbulos pulmonares con fenómenos de vasculitis sin necrosis fibrinoide y hemorragia pulmonar difusa. En los cultivos de cultivo pulmonar se desarrollaron *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.* y *Bacteroides fragilis*; resultando negativos para bacilos ácido alcohol resistentes, hongos filamentosos y *Legionella*. El estudio por inmunofluorescencia indirecta (IFI) no reveló la presencia de *Pneumocystis carinii*. Las tinciones histoquímicas de tejido pulmonar (Gram, metenamina argéntica, Giemsa y Zielh-Neelsen) fueron negativas. La inmunotinción para citomegalovirus (C.M.V.) con escasas células positivas a L.S.D. La inmunotinción para herpes resultó negativa. Se observó la presencia de varios fragmentos hísticos de color blanquecino agrupados de 0'4 cm de diámetro, siéndole diagnosticando "daño alveolar inespecífico en fase proliferativa". El estudio microscópico de esta zona indicó la presencia de amebas. El cultivo posterior realizado en medio de PAGE confirmó su presencia.

7.3.2.- Historia clínica del paciente BCN-7.

Paciente varón de 15 años de edad, diagnosticado de linfoma no Hodgking de células grandes de inmunofenotipo B.

Al debut presentaba un cuadro clínico de un mes de evolución de dolores óseos en raquis, esternón y disestesias de extremidades inferiores. Sin presentar adenopatías laterocervicales, supraclaviculares, axilares e inguinales. Con aparato cardiorrespiratorio normal. No se palpaban adenomegalias, con abdomen blando y depresible. Esplenomegalia dura, de 5-6 cm por debajo de reborde costal. Pares craneales conservados. Meningismo. Signo de Lassege positivo. Discreta pérdida de fuerza en dedos de la mano izquierda (comparado con la contralateral) sin otras focalidades neurológicas.

El hemograma y el aspirado y la biopsia de médula ósea fueron normales, con LCR libre de blastos.

Se practicó TAC toracoabdominal presentando masa adenopática mediastínica subcarinal y en hilio pulmonar derecho. En el abdomen se observan múltiples adenopatías mesentéricas que rodean la aorta y tronco celíaco. Las asas intestinales están parcialmente rellenas, con aspecto normal. Importante esplenomegalia y en el interior de bazo se observan importantes imágenes hipodensas circulares. Imágenes nodulares en el interior del parénquima hepático. El páncreas y ambos riñones tienen un tamaño, morfología y densidad normales. Las estructuras pélvicas son normales.

La resonancia magnética craneo-espinal detectó alteración de la señal multifocal en médula ósea de los cuerpos vertebrales con evidencia de destrucción cortical y masa extraósea asociada que invade el espacio epidural en varias localizaciones.

Gammagrafía con galio negativa.

Se procedió a exéresis quirúrgica de adenopatía mesentérica de 4 x 3 cm, mediante laparotomía media (para llegar a un diagnóstico anatomopatológico definitivo). La biopsia informó del diagnóstico de Linfoma no Hodgking de células grandes inmunofenotipo B. El

cultivo de la adenopatía mesentérica resultó negativa a bacterias, virus, hongos y micobacterias, tras cultivo en solución de PAGE se detectó la presencia de amebas.

Se inició quimioterapia con el protocolo de la sociedad francesa de oncología pediátrica LMB-89 grupo C. En tratamiento durante siete meses y medio tolerándolo bien. En la evaluación practicada a los tres meses de iniciado el tratamiento persistía la adenopatía hilar pulmonar derecha, pero de menor tamaño. El resto de las localizaciones aparecían libres de enfermedad. A los nueve meses de iniciado el tratamiento persistía la adenopatía hilar pulmonar tras haber finalizado el tratamiento. Dado que la gammagrafía fue negativa se solicitó la práctica de Tomografía de emisión de Positrones.

7.3.3.- Historia clínica del paciente LCR-19.

Paciente varón de 11 años de edad, inmunocompetente, que había comenzado diez días antes de su ingreso con una hipertermia, con una temperatura máxima de 39° C, con cefalea frontal y con vómitos, de una a dos veces al día, junto con decaimiento y rechazo parcial de la alimentación. Los exámenes complementarios realizados tras la punción lumbar mostraron una bioquímica del líquido cefalorraquídeo con unos niveles normales de glucosa (55mg/dl) y proteínas (0'45 gr/l). Con unos niveles de leucocitos de 60 células por mm³, con un 90 % de polimorfonucleares y 10 % de neutrófilos. Se diagnosticó como meningitis de líquido claro, como una probable enterovirus. El paciente permaneció hospitalizado durante 5 días con tratamiento antitérmico y analgésico, transcurrido este tiempo se le dio el alta para su seguimiento ambulatorio.

Identificada la presencia de *A. astronyxis* en LCR, tanto por PCR directamente de la muestra biológica, como tras la aparición de amebas en cultivo, el paciente fue llamado de nuevo a consulta y volviéndose a practicar una punción lumbar con el fin de repetir los análisis. En esta ocasión tanto la PCR como el cultivo resultaron negativos.

BIBLIOGRAFÍA

8.- BIBLIOGRAFÍA.

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill. 4ª Edición (2000).

Alizadeh, H., Pidherney, M.S., McCulley, J.P. & Niederkorn, J.Y. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. *Infect. Immun.* 62: 1298-1303 (1994).

Alizadeh, H.; He, Y.; McCulley, J.P.; Ma, D.; Stewart, G.L.; Via, M.; Haehling, E. & Niederkorn, J.Y. Successful immunization against *Acanthamoeba* keratitis in a pig model. *Cornea*.14:180-186 (1995).

Alonso, V.C. Aplicación de RAPD para el diagnóstico y estudio molecular de *Leishmania braziliensis*. Tesis Doctoral (1999).

Alves, J.M., Gusmao, C.X., Teixeira, M.M., Freitas, D., Foronda, A.S. & Affonso, H.T. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 19-26 (2000).

Amoils, S.P., Heney, C. *Acanthamoeba* keratitis with live isolates treated with cryosurgery and fluconazole. *Am. J. Ophthalmol.* 127: 718-720 (1999).

Andresen, K.; Ibrahim, M.E.; Theander, T.G. & Kharazmi, A. Random amplified polymorphic DNA for the differentiation of *Leishmania donovani* isolates from Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 9: 204-205 (1996)..

Armstrong, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect. Dis. Rev.* 2: 65-73 (2000).

Avery, S.V., Lloyd, D. & Harwood, J.L. Temperature-dependent changes in plasma-membrane lipid order and the phagocytotic activity of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* are closely correlated. *Biochem. J.* 15: 811-816 (1995).

Bacon, A.S.; Dart, J.K.; Ficker, L.A.; Matheson, M.M. & Wright, P. *Acanthamoeba* keratitis. The value of early diagnosis. *Ophthalmology.* 100: 1238-1243 (1993-a).

Bacon, A.S., Frazer, D.G., Dart, J.K.G., Matheson, M., Ficker, L.A. & Wright, P.. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis. *Eye.* 7: 719-725 (1993-b).

Badenoch, P.R., Johnson, A.M., Christy, P.E. & Coster D.J. Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in the rat cornea. *Arch. Ophthalmol.* 108: 107-112 (1990).

Barker, J., Lambert, P.A. & Brown, M.R.W. Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 61: 3503-3510 (1995-a).

Barker, J., Scaife, H. & Brown MR. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 2684-2688 (1995-b).

Baverstock, P.R., Illana, S., Christy, P.E., Fuerst, P.A. & Johnson, A.M. srRNA evolution and phylogenetic relationships of the genus *Naegleria*. *Mol. Biol. Evol.* 6: 243-257 (1989).

Beebe, S.E.; Ochoa, I; Skroch, P.W.; Nienhuis, J; Tivang, J. *Genetic diversity among common-band breeding lines developed for Central America. Crop. Sci.* 35: 1173-1178 (1995).

Berger, S.T.; Mondino, B.J.; Hoft, R.H.; Donzis, P.B.; Holland, G.N.; Farley, M.K, & Levenson, J.E. Successful medical management of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 110: 395-403 (1990).

Berke, G. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Lymphocyte-triggered internal target disintegration. *Immunol. Today.* 12: 396-399 (1991).

Berry, M. & Easty, D.L. Isolated human and rabbit eye models of corneal toxicity. *Toxicology in vitro.* 7: 461-464 (1993).

Biddick, C.J.; Rogers, L.H. & Brown, T.J. Viability of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 859-860 (1984).

Bielawski, J.P.; Noack, K. & Pumo, D.E. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *Biotechniques.* 18: 856-860. (1995).

Blackman, H.J.; Rao, N.A.; Lemp, M.A. & Visvesvara, G.S. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated with penetrating keratoplasty: suggested immunogenic mechanisms of action. *Cornea*. 3: 125-130 (1984).

Bottone, E.J. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mt. Sinai. J. Med.* 60: 260-270. Review (1993).

Bowe, E.C. & Sawyer, T.K. Marine flora and fauna of the Northeastern United States. Protozoa: Sarcodina: Amoebae. *N. Technical Report NMFS*. 419: 1-56 (1979).

Bowers, B. & Korn, E.D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell. Biol.* 41: 786-805 (1969).

Brandt, F.H.; Ware, D.A. & Visvesvara, G.S. Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1144-1146 (1989).

Brooks, J.G. Jr.; Coster, D.J. & Badenoch, P.R. *Acanthamoeba* keratitis. Resolution after epithelial debridement. *Cornea*. 13:186-189 (1994).

Butt, L.G. Primary amoebic meningoencephalitis. *New Eng. J. Med.* 274: 1473-1476 (1966).

Byers, T.J. molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *Intl. Rev. Cytol.* 99: 311-341 (1986).

Byers, T.J., Hugo, E.R. & Stewart, V.J. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (a review). *J. Protozool.* 37: 17S-25S (1990).

Byers, T.J., Kim, B.G., King L.E. & Hugo, E.R. Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13: 378-384 (1991).

Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* 235: 157-165 (1992).

Caetano-Anolles, G. & Bassam, B.J. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42: 189-200. (1993).

Casper, T., Basset, D., Leclercq, C., Fabre, J., Peyron-Raison, N. & Reynes, J. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy. *Clin. Infect. Dis.* 29: 944-945 (1999).

Cengiz, A.M., Harmis, N. & Stapleton, F. Co-incubation of *Acanthamoeba castellanii* with strains of *Pseudomonas aeruginosa* alters the survival of amoeba. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 28: 191-193 (2000).

Cerva, L. Studies of limax amoebas in a swimming pool. *Hydrobiologica.* 38: 141-161 (1971).

Cerva, L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*. Occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 33: 99-103 (1989).

Cleland, P.G., Lawande, R.V., Onyemelukwe, G. & Whittle, H.C. Chronic amebic meningoencephalitis. *Arch. Neurol.* 39: 56-57 (1982).

Cohen, E.J.; Parlato, C.J.; Arentsen, J.J.; Genvert, G.I.; Eagle, R.C. Jr.; Wieland, M.R. & Laibson, P.R. Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 103: 615-625 (1987).

Comes, A.M.; Humbert, J.F. & Laurent, F. Rapid cloning of PCR-derived RAPD probes. *Biotechniques.* 23:210-2 (1997).

Connor, C.G.; Blocker, Y. & Pitts, D.G. *Acanthamoeba culbertsoni* and contact lens disinfection systems. *Optom. Vis. Sci.* 66: 690-693 (1989).

Connor, C.G., Hopkins, S.L. & Salisbury, R.D. Effectivity of contact lens disinfection systems against *Acanthamoeba culbertsoni*. *Optom. Vis. Sci.* 68: 138-141(1991).

Cordingley, J.S., Wills, R.A. & Villemez, C.L. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *J. Cell. Biochem.* 61: 167-171 (1996).

Costas, M. & Griffiths, A.J. Physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates. *J. Protozool.* 33: 304-309 (1986).

Culbertson, C.G., Smith, J. & Minner, J. *Acanthamoeba*: Observation on animal pathogenicity. *Science.* 127:1506 (1958).

Culbertson, C.G., Smith, J., Cohen, H.K. & Minner, J. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Clin. Pathol.* 35: 185-197 (1959).

Culbertson, C.G. The patogenicity of soil amoebas. *Ann. Rev. Microbiol.* 25: 231-254 (1971).

Culbertson, C.G. Amoebic meningoencephalitis. *Antiparasitic chemotherapy*. 30: 28-53 (1981).

Cursons, R.T.M., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M. & Till, D. Immunity to pathogenic free-living amoeba: role of humoral antibody. *Infect. Immun.* 29: 401-407 (1980).

Curtis, H & Barnes, N.S. Biología. Quinta Edición. *Editorial Médica Panamericana*. pp: 172-180 (1993).

Czajka, J. & Batt, C.A. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1280-1287 (1994).

Chagla, A.H. & Griffiths, A.J. Growth and encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* 85: 139-45 (1974).

Chang, S.L. Small free-living amoeba: Cultivation, quantitation, identification, pathogenesis and resistance. *Cur. Top in Comparative Pathobiol.* 1: 201-236 (1971).

Chang, P.C. & Soong, H.K. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch. Ophthalmol.* 109: 463-464 (1991).

Daggett, P.M., Lipscomb, D.S., Thomas, K. & Nerad, T.A. A molecular approach to the phylogeny of *Acanthamoeba*. *Biosystems.* 18: 399-405 (1985).

D'Aversa, G.; Stern, G.A. & Driebe, W.T. Jr. Diagnosis and successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Arch. Ophthalmol.* 113: 1120-1123 (1995).

Davies, D.J.G., Anthony, Y. & Meakin, B.J. Evaluation of the anti-*Acanthamoeba* activity of five contact lens disinfectants. *Int. Contact Lens Clin.* 17: 14-20 (1990).

De Jonckheere, J. & Van de Voorde, H. The distribution of *N. fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop.* 26: 10-19 (1977).

De Jonckheere, J. Growth characteristic, cytopathic effect in cell culture and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 681-85 (1980).

De Jonckheere, J. Studies on pathogenic free-living amoebas in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur.* 71: 701-706 (1981).

De Jonckheere, J. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 30: 701-706 (1983).

De Jonckheere, J. Ecology of *Acanthamoeba*. *Revs. Infect. Dis.* 13: S385-387 (1991).

Deluol, A.M., Teilhac, M.F., Poirot, J.L., Maslo, C., Luboinski, J., Rozenbaum, W. & Chatelet, F.P. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp. in a patient with AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 130-131 (1996).

Derrick E.H. A fatal case of generalised amoebiasis due to a protozoon closely resembling, if not identical with, *Iodamoeba butschlii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 42: 191-198 (1948).

Donnelly, H., Bernard, E.M., Rothkotter, H., Gold, J.W.M. & Armstrong, D. Distribution of pentamidine in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 157: 985-989 (1988).

Donzis, P.B., Mondino, B.J., Weissman, B.A. & Bruckner, D.A. Microbial analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba*. *Am. J. Ophthalmol.* 108: 53-56 (1989).

Dougherty, P.J., Binder, P.S., Mondino, B.J., et al. *Acanthamoeba* sclerokeratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 117: 475-479 (1994).

Dryden, R.C. & Wright, S.J.L. Predation of cyanobacteria by protozoa. *Can. J. Microbiol.* 33: 471-481 (1987).

Duguid, I.G., Dart, J.K.G., Morlet, N., Allan, B.D., Matheson, M., Ficker, L. & Tuft, S. Outcome of *Acanthamoeba* keratitis treated with PHMB and propamidine. *Ophthalmology.* 104: 1587-1592 (1997).

Duma, R.J., Rosonblum, W.P., Me Gobe, R.F., Jones, M.M. & Nelson, E.C. PAME caused by *Naegleria*. Two new cases response to Amphotericin B and a review. *Ann. Intern. Med.* 74: 923-931 (1971).

Duma, R.J. Primary amoebic meningoencephalitis. *Crit. Rev. Lab. Sci.* 3: 163-192 (1972).

Dykova, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Booton, G.C. & Byers, T.J. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J. Parasitol.* 85: 1106-13 (1999).

Elder, M.J., Kilvington, S. & Dart, J.K.G. A clinicopathological study of in vitro sensitivity testing and *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 1059-1064 (1994).

Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. & Honeycutt, R.L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*. 14: 214-217 (1993).

Farley, D. Keeping an eye on contact lenses. *FDA Consumers*. Publication No. (FDA) 98-4267 (1998).

Ferrante, A. & Rowan-Kelly, B. Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 477-485 (1983).

Ferrante, A. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol.* 13: 31-47 (1991-a).

Ferrante, A. Immunity to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 5: 403-409 (1991-b).

Ficker, L.A., Kirkness, C. & Wright, P. Prognosis for keratoplasty in *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*. 100: 105-110 (1993).

Flores, B.M., Garcia, C.A., Stamm, W.E. & Torian, B.E. Differentiation of *Naegleria fowleri* from *Acanthamoeba* species by using monoclonal antibodies and flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1999-2005(1990).

Fowler, M. & Carter, R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. A preliminary report. *Brit. Med. J.* 2: 740-742 (1965).

Friedland, L.R., Raphael, S.A., Deutsch, E.S. et al. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11: 404–407 (1992).

Fritsche, T.R., Gautam, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L. & Lindquist, T.D. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1122-1126 (1993).

Fulcher, T. & Dart, J.K.G. Complicaciones de las lentes de contacto; Capítulo 17: Queratitis por *Acanthamoeba*. <http://www.ofthalmored.com/lentes/cap17.htm> (1998).

Fulton, C. Macromolecular synthesis during the quick-change act of *Naegleria*. *J. Protozool.* 30: 192-198 (1983).

Galarza, C., Larrea, P. & Kumakawa, H. Amebiasis cutánea de vida libre. Primer caso reportado en el Hospital Nacional “Dos de Mayo”, Lima-Perú. *Dermatología Peruana*. Vol 7, Nº 1 (1995).

Garner, A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis hypothesis based on histological analysis of 30 cases. *Br. J. Ophthalmol.* 77: 366-370 (1993).

Gonzalez, M.M., Gould, E., Dickinson G, et al. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110: 749-751 (1986).

Gray, T.B., Cursons, T.M., Sherwan, J.F. & Rose, P.R. *Acanthamoeba*, bacterial and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br. J. Ophthalmol.* 79: 601-605 (1995).

Griffin, J.L. Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae. *Science*. 178: 869-70 (1972).

Griffin, J.L. Environmental samplings for pathogenic *Naegleria*. *J. Protozool.* 20: 497-98 (1973).

Griffiths, A.J. & Hughes, D.E. The physiology of encystment of *Hartmannella castellanii*. *J. Protozool.* 16: 93-99 (1969).

Griffiths, A.J. Encystment of *Acanthamoeba*. In: Rose, A.H. & Wilkinson, J.F. (ed.). *Adv. Microb. Physiol.* Academic Press, London. pp: 105-129 (1970).

Grudman, H., Schneider, C.H., Tichy, H.V., Simon, R., Klare, Y., Hartung, D. & Daschner, F.D. Automated laser fluorescent analysis of randomly amplified polymorphic DNA: a rapid method for investigating nosocomial transmission for *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiology*. 43: 1-6 (1995).

He, Q., Viljanen, M.K. & Mertsola J. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Mol. Cell. Probes*. 8: 155-159 (1994).

Helton, J., Loveless, M. & White. C.R. Jr. Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. *Am. J. Dermatopathol.* 15: 146-149 (1993).

Hines, T. & Gladys, X. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 5: 387-388 (1996).

Hirano, K. & Sai, S. Hirano Severe *Acanthamoeba* sclerokeratitis in a non-contact lens wearer. *Acta. Ophthalmol. Scand.* 77: 347-348 (1999).

Holland, E.J.; Alul, I.H.; Meisler, D.M.; Epstein, R.J.; Rotkis, W.M.; Nathenson, A.L. & Liesegang, T.J. Subepithelial infiltrates in *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 112 :414-418 (1991).

<http://mac2031.fujimi.hosei.ac.jp/PDB/Galleries/indexE.html>

Hunt, S.J., Reed, S.L., Mathews, W.C. & Torian, B. Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multidrug therapy. *Cutis.* 56: 285-287 (1995).

Hurt, M., Apte, S., Leher, H., Howard, K., Niederkorn, J. & Alizadeh, H. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect. Immun.* 69: 2988-2995 (2001).

Illingworth, C.D. & Cook, S.D. *Acanthamoeba* keratitis. *Surv. Ophthalmol.* 42: 493-508 (1998).

Illingworth, C.D., Cook, S.D, Karabatsas, C.H. & Easty, D.L. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. *Br. J. Ophthalmol.* 79: 1078-1082 (1995).

Ishibashi, Y.; Matsumoto, Y.; Kabata, T.; Watanabe, R.; Hommura, S.; Yasuraoka, K. & Ishii, K. Oral itraconazole and topical miconazole with debridement for *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 109: 121-126 (1990).

Jantzen, H., Schulze, I. & Stohr M. Relationship between the timing of DNA replication and the developmental competence in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell. Sci.* 91:389-399 (1988).

John, D.T. & Howard, M.J. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol. Res.* 81: 193-201 (1995).

John, D.T. & John, R.A. Viability of pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* and virulence of *N. fowleri* during long-term cryopreservation. *Folia. Parasitol. (Praha)*. 43:43-6 (1996).

John, T., Desai, D. & Sahm, D. Adherence of *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites to unworn soft contact lenses. *Am. J. Ophthalmol.* 108: 658-664 (1989).

John, T. Interactions of bacteria and amoebae with ocular biomaterials. *Cells and Materials*. 1: 129-239 (1991).

John, T. Opportunistic amoebae. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th edition, *Oxford University Press*. 5: 179-192 (1998).

Johns, K.J.; Head, W.S. & O'Day, D.M. Corneal toxicity of propamidine. *Arch. Ophthalmol.* 106: 68-69 (1988).

Johnson, A.M., Fielke, R., Christy, P.E., Robinson, B. & Baverstock, P.R. Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *J. Gen. Microbiol.* 136:1689-98 (1990).

Kelly, L.D. & Xu, L. The effect of *Acanthamoeba* concentration on adherence to four types of unworn soft contact lenses. *CLAO J.* 21: 27-30 (1995).

Kelly, L.D., Long, D. & Mitre, D. Quantitative comparison of *Acanthamoeba castellanii* adherence to rigid versus soft contact lenses. *CLAO J.* 21: 111-113. (1995).

Khalife, G.E., Pamuccian, S.E., Visvesvara, G.S. & Horten, B. Disseminated *Acanthamoeba* infection masquerading as bacillary angiomatosis in a patients with AIDS. Case report and literature review. *Int. J. Surg. Path.* 2: 11 (1994).

Khan, N.A. Pathogenicity, porfology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology.* 43: 391-395 (2001)

Khan, N.A., Greenman, J., Topping, K.P., Hough, V.C., Temple, G.S. & Paget TA. Isolation of *Acanthamoeba*-specific antibodies from a bacteriophage display library. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2374-2377 (2000).

Khunkitti, W., D. Lloyd, J.R. Furr, & Russel, A.D. *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36: 43-38. 1998

Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J.R. & Russell, A.D. *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36: 43-48 (1998).

Kihara, A. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/PCD0307/htmls/12.html>

Kihara, A. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/PCD0307/htmls/34.html>

Kilvington, S. & Warhurst, D.C. Isolation of amoebas from the air. *J. Med. Microbiol.* 2: 27-36 (1969).

Kilvington, S. Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectants on pathogenic free-living amoebas. *Int. Biodeter.* 26: 137-138 (1990).

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

Kilvington, S. & Price, J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 519-525 (1990).

Kilvington, S. *Acanthamoeba* trophozoite and cyst adherence to four types of soft contact lens and removal by cleaning agents. *Eye.* 7: 535-538 (1993).

Kilvington, S. Actividad de los desinfectantes de lentes de contacto contra especies de *Acanthamoeba*. *Gaceta óptica.* 325: 28-32 (1999).

Kim, B.G., Sobota, A., Bitonti, A.J., McCann, P.P. & Byers, T.J. Polyamine metabolism in *Acanthamoeba*: polyamine content and synthesis of ornithine, putrescine, and diaminopropane. *J. Protozool.* 34: 278-284 (1987).

King, C.A., Preston, T.M. & Miller, R.H. Cell-substrate interaction during amoeboid locomotion of *Naegleria* with special reference to alterations in temperature and electrolyte concentration of the medium. *Protoplasma.* 118:10-18 (1983).

Krahenbuhl, O & Tschopp, J. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol. Today*. 12: 399-402 (1991).

Larkin, D.F. & Easty, D.L. Experimental *Acanthamoeba* keratitis: I. Preliminary findings. *Br. J. Ophthalmol.* 74: 551-5 (1990).

Larkin, D.F.; Kilvington, S. & Easty, D.L. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *Br. J. Ophthalmol.* 74: 133-135 (1990).

Larkin, D.F.; Kilvington, S. & Dart, J.K. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology*. 99: 185-191 (1992).

Leher, H., Silvany, R., Alizadeh, H., Huang, J. & Niederkorn, J.Y. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 66: 5-10 (1998).

Levey, S.B. & Cohen, E.J. Methods of disinfecting contact lenses to avoid corneal disorders. *Surv Ophthalmol.* 41: 245-251 (1996).

Lindquist, T.D.; Doughman, D.J.; Rubenstein, J.B.; Moore, J.W. & Campbell, R.C. *Acanthamoeba*-contaminated hydrogel contact lenses. Susceptibility to disinfection. *Cornea*. 7: 300-303 (1988).

Lindquist, T.D.; Sher, N.A. & Doughman, D.J. Clinical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba* keratitis. *Arch. Ophthalmol.* 106: 73-77 (1988).

Lindquist, T.D.; Fritsche, T.R. & Grutzmacher, R.D. Scleral ectasia secondary to *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 9:74-76 (1990).

Lloyd, D., Protheroe, R., Williams, T.N. & Williams, J.L. Adaptation of the respiratory system of *Acanthamoeba castellanii* to anaerobiosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 143-146 (1983).

Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R. & Russell A.D. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 11-16 (2001).

Long, E.O. & Dawid, I.B. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 727-764 (1980).

Lotti, R & Dart, J.K. Cataract as a complication of severe microbial keratitis. *Eye*. 6: 400-403 (1992).

Ludwig, I.H., Meisler, D.M., Rutherford, I., Bican, F.E., Langston, R.H. & Visvesvara, G.S. Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27: 626-628 (1986).

Ma, P., Visvesvara, G.S., Martinez, A.J., Theodore, F.H., Daggett, P.M. & Sawyer, T.K. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev. Infect. Dis.* 12: 490-513 (1990)

Mandell, L.A. Infections in the compromised host. *J. Int. Med. Res.* 18: 177-190 (1990).

Maniatis, T., Sambrook, J. & Fritsch, E.F. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Marciano-Cabral, F. & John, D.T. Cytopathology of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1133-1137 (1986).

Marciano-Cabral, F. & Petri, W. Free-living ameba. In: Mandel, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th Edition, Churchill Livingstone. 2: 2408-2415 (1995).

Martínez, A.J. & Amado-Ledo, D.E. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amebas de vida libre. *Protozoología, epidemiología y neuropatología. Morfología Normal y Patológica*. 3: 679-704 (1979).

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

Martínez, A.J. & Jautechke, R. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: A review. *Infection*. 13: 215-256 (1985).

Martinez, A.J. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 5: 399-402 (1991).

Martinez, A.J., Guerra, A.E., Garcia-Tamayo, J., Céspedes, G., Gonzalez-Alfonzo, J.E. & Visvesvara, G.S. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.* 87 :430-434 (1994).

Martinez, A.J. & Visvesvara, G.S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598. Review (1997).

Mathers, W.D., Sutphin, J.E., Folberg, R., Meier, P.A., Wenzel, R.P. & Elgin, R.G. Outbreak of keratitis presumed to be caused by *Acanthamoeba*. *Am. J. Ophthalmol.* 121: 129-142 (1996).

Mathers, W.D., Sutphin, J.E., Lane, J.A. & Folberg, R. Correlation between surface water contamination with amoeba and the onset of symptoms and diagnosis of amoeba-like keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* 82: 1143-1146 (1998).

Mazur, T., Hadas, E. & Iwanicka, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop. Med. Parasitol.* 46: 106-108 (1995).

McDonnell, G. & Russell, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 147-179 (1999).

Meisler, D.M., Ludwig, I.H., Rutherford, I., Bican, F.E., Langston, R.H. & Visvesvara, G.S. Susceptibility of *Acanthamoeba* to cryotherapeutic method. *Arch. Ophthalmol.* 104: 130-131 (1986).

Mergeryan, H. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev. Infect. Dis.* 13: S390-391 (1991).

Meunier, J.R. & Grimot, P.A. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373-379 (1993).

Mietz, H. & Font, R.L. *Acanthamoeba* keratitis with granulomatous reaction involving the stroma and anterior chamber. *Arch. Ophthalmol.* 115: 259-263 (1997).

Miltner, E.C. & Bermúdez, L.E. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1990-1994 (2000).

Moore, M.B., McCulley, J.P., Luckenbach, M., Gelender, H., Newton, C., McDonald, M.B. & Visvesvara, G.S. *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am. J. Ophthalmol.* 100: 396-403 (1985).

Moore, M.B. *Acanthamoeba* keratitis. *Arch. Ophthalmol.* 106: 1181-1540 (1988).

Moore, M.B. & McCulley, J.P. *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses: six consecutive cases of successful management. *Br. J. Ophthalmol.* 73: 271-275 (1989).

Moore, M.B. *Acanthamoeba* keratitis and contact lens wear: the patient is a fault. *Cornea.* 1: 33-35 (1990).

Moore, M.B., Ubelaker, J.E., Martin, J.H., Silvany, R., Dougherty, J.M., Meyer, D.R. & McCulley, J.P. In vitro penetration of human corneal epithelium by *Acanthamoeba castellanii*: a scanning and transmission electron microscopy study. *Cornea.* 10: 291-298 (1991).

Morlet, N., Duguid, G., Radford, C., Matheson, M. & Dart, J. Incidence of *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear. *Lancet.* 350: 414-417 (1997).

Moura, H., Wallace, S. & Visvesvara, G.S. *Acanthamoeba healyi* n. sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp. Groups I and III. *J. Protozool.* 39: 573-583 (1992).

Munthali, M., Ford-Lloyd, B.V. & Newbury, H.J. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR. Methods. Appl.* 1: 274-276 (1992).

Murakawa, G.J., McCalmont, T., Altman, J., Telang, G.H., Hoffman, M.D., Kantor, G.R. & Berger, T.G. Disseminate acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. *Arch-Dermatol.* 131: 1291-1296 (1995).

Myers, L.E., Silva, S.V., Procunier, J.D. & Little, P.B. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* 31: 512-517 (1993).

Nagata, N. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/PCD3379/htmls/21.html>

Nagata, N. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/PCD3379/htmls/28.html>

Nagata, N. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/PCD3379/htmls/36.html>

Naveed, A.K. Pathogenicity, porfology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology.* 43: 391-395 (2001).

Neff, R.J., Ray, S.A., Benton, W.F. & Wilborn, M. Induction of synchronous encysment (differentiation) in *Acanthamoeba sp.*. In: Prescott, D.M. (ed.), *Methods in Cell Physiology.* Vol. 1. Academic Press, New York. pp: 55-83 (1964).

Neff, R.J. & Neff, R.H. The biochemistry of amoebic encystment. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 23:51-81 (1969).

Neff, R.J. & Neff, R.H. Induction of differentiation in *Acanthamoeba* by inhibitors. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.* 39: 112-168 (1972).

Nieder Korn, J.Y., Ubelaker, J.E., McCulley JP, Stewart, G.L., Meyer, D.R., Mellon, J.A., Silvano, R.E., He, Y.G., Pidherney, M., Martin, J.H., et al.. Susceptibility of corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33: 104-112 (1992).

Nieder Korn, J.Y., Alizadeh, H., Leher, H. & McCulley, J.P. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes. Infect.* 1: 437-43 (1999).

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

Niszl, I.A. & Markus, M.B. Anti-*Acanthamoeba* activity of contact lens solutions. *Br. J. Ophthalmol.* 82: 1033-1038 (1998).

Novy, R.C., Kobac, C., Goffreda & Vorsa, N. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry [*Vaccinium macrocarpon* (Ait) Pursh]. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1004-1010 (1994).

Noyes, H.A., Belli, A.A. & Maingon, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 98-105 (1996).

Oliva, S., Jantz, M., Tiernan, R., Cook, D.L. & Judson, M.A. Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis. *South. Med. J.* 92:55-57 (1999).

Page, F.C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.* 14: 709-724 (1967).

Paget T., Khan N, Temple, G., Hough V. & Greenman J. Use of phage antibodies to distinguish closely related species of protozoan parasites. *Dis. Markers.* 16: 83-90 (2000).

Panda, N., Pushker, N., Satpathy, G. & Naik, N. *Acanthamoeba* keratitis following optical keratoplasty. *Eye.* 13: 588-589 (1999).

Paniagua, M.E. Estudio de las amebas limax aisladas a partir de aguas de fuentes en las provincias La Coruña y Pontevedra. Investigación a nivel de la mucosa nasal del hombre. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (1988).

Panjwani, N.; Zhao, Z.; Baum, J.; Pereira, M. & Zaidi, T. *Acanthamoebae* bind to glycolipids of rabbit corneal epithelium. *Infect. Immun.* 60: 3460-3463 (1992).

Park, C. H., Iyengar, V., Hefter, L., Pestaner, J. P. & Vandel, N. Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Lab. Med.* Jun. 25: 386-388 (1994).

Parrish, C.M.; Head, W.S.; O'Day, D.M. & Rowlett, W. *Acanthamoeba* keratitis following keratoplasty without other identifiable risk factors. *Arch. Ophthalmol.* 109: 471 (1991).

Patterson M, Woodworth TW, Marciano-Cabral F, Bradley SG. Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *J. Bacteriol.* 147(1):217-26 (1981).

Pearl, M., Wiliaert, E., Kenneth, B., Juochter, R. & Stevens, R. A case of keratitis due to *Acanthamoeba* in New York. *J. Infect. Dis.* 143: 662-67 (1981).

Pearl, M. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Rev. Infect. Dis.* 12: 490-513 (1990).

Pellegrin, J.L.; Ortega-Barria, E.; Barza, M.; Baum, J. & Pereira, M.E. Neuraminidase activity in *Acanthamoeba* species trophozoites and cysts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32: 3061-3066 (1991).

Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.J. & Fedak G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* 2: 341-345 (1993).

Perrine, D., Chenu. J.P., Georges, P., Lancelot, J.C., Saturnino, C. & Robba, M. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 339-342 (1995).

Pettit, D.A., Williamson, J., Cabral, G.A. & Marciano-Cabral, F. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba spp.*: a transmission and scanning electron microscopy study. *J. Parasitol.* 82: 769-777 (1996).

Pidherney, M.S., Alizadeh, H., Stewart, G.L., McCulley, J.P. & Niederkorn, J.Y. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. *Cancer Lett.* 72: 91-98 (1993).

Preston, T.M. & King, C.A. Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2317-2323 (1984).

Protist Information Server. http://130.158.208.53/www/Protist_menuE.html

Pussard, M. La morphologie des amibes libres, intérêt et principes d'études. *Ann. Soc. belge. Méd. Trop.* 54: 249-257 (1974).

Pussard, M. & Pons, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistologica.* 13: 557-598 (1977).

Pussard, M. & Pons, R. Étude des pores kystiques de *Naegleria* (Vahlkampfiidae Amoebidae). *Protistologica.* 15: 163-175 (1979).

Quiros, C.F.; This, P.; Laudine, M.; Benet, A.; Chevre, A. & Delseny, M. Analysis of a set of RAPD markers by hybridisation and sequencing in *Brassica*: a note of caution. *Plant. Cell. Report.* 14:630-634 (1995).

Radford, C.F., Bacon, A.S., Dart, J.K.G. et al. Risk factors for *Acanthamoeba* keratitis in contact users: a case control study. *Br. Med. J.*; 310: 1567-1570 (1995).

Radford, C., Lehman, O. & Dart, J.K.G. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. *Br. J. Ophthalmol.* 82: 1387-1392 (1998).

Reiter, R.S., Williams, J.G., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. & Scolnik, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89: 1477-1481 (1992).

Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. & Robles, E. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ. Res.* 33: 428-440 (1984).

Rodríguez-Zaragoza, S. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 225-241 (1994).

Rosenberg, A.S. & Morgan, M.B. Disseminated acanthamoebiasis presenting as lobular panniculitis with necrotizing vasculitis in a patient with AIDS. *J. Cutan. Pathol.* 28: 307-313 (2001).

Rosenthal, R.A., Stein, J.M., McAnally, C.L. & Schlech, B.A. A comparative study of the microbiologic effectiveness of chemical disinfectants and peroxide-neutralizer systems. *CLAO J.* 21: 99-110 (1995).

Rowbotham, T.J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33: 1179-1183 (1980).

Rubin, R.W. & Maher, M. Actin turnover during encystation in *Acanthamoeba*. *Exp. Cell. Res.* 103: 159-168. (1976).

Sadaka, H.A. & Emam, E.E. Is the intestinal tract a portal of entry for *Acanthamoeba* infection? *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31: 781-790 (2001).

Sadhna, G. & Das, S.R. Stock cultures of free-living amoebas: effect of temperature on viability and pathogenicity. *J. Parasitol.* 85: 139-141. (1999).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning* (1989).

Samples, J.B., Binder, P.S., Luibel, F.J., Font, R.L., Visvesvara, G.S., Peter & C.R.. *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch. Ophthalmol.* 102: 707-710 (1984).

Sands, M., Kron, M.A. & Brown, R.B. Pentamidine: a review. *Rev. Infect. Dis.* 7: 625-634 (1985).

Sangruchi, T., Martinez, A.J. & Visvesvara, G.S. Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 25: 309-313 (1994).

Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G. & Andremont, A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 982-985 (1993).

Schaudin, F. Untersuchungen Über die Fortlanzung der Rhizopoden. *Arb. Kais. Gesundheitsamte.* 19:547-576 (1903).

Schaumberg, D.A., Snow, K.K. & Dana, M.R. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand?. *Cornea.* 17: 3-10 (1998).

Schierwater, B. & Ender, A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic. Acids. Res.* 21: 4647-4648 (1993).

Seal, D., Stapleton, F. & Dart, J. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers. *Br. J. Ophthalmol.* 76: 424-427 (1992).

Seal, D.V., Bennet, E.S., McFadyen, A.K., Todd, E. & Tomlinson, A. Differential adherence of *Acanthamoeba* to contact lenses: effects of material characteristics. *Optom. Vis. Sci.* 72 (1): 23-28 (1995).

Seal, D., Hay, J., Kirkness, C., Morrell, A., Booth, A., Tullo, A., Ridgway, A. & Armstrong, M. Successful medical therapy of *Acanthamoeba* keratitis with topical chlorhexidine and propamidine. *Eye.* 10: 413-421 (1996).

Seijo Martínez, M., González-Mediero, G., Santiago, P., Rodríguez De Lope, A., Diz, J., Conde, C. & Visvesvara, G.S. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3892-3895 (2000).

Selby, D.M., Rakusan, T.A., Markle, B.M., & Visvesvara, G.S.. Amebic osteomyelitis in a child with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.* 18: 89-95 (1998).

Sharma, S.; Srinivasan, M. & George, C. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch. Ophthalmol.* 108: 676-678 (1990).

Sharma ,S.; Ramachandran, L. & Rao, G.N. Adherence of cysts and trophozoites of *Acanthamoeba* to unworn rigid gas permeable and soft contact lenses. *CLAO J.* 21: 247-251 (1995).

Sharma, S., Garg, P. & Rao, G.N. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* 84: 1103-1108 (2000).

Shin, H.J., Cho, M.S., Kim, H.I., Lee, M., Park, S., Sohn, S. & Im, K.I. Apoptosis of primary-culture rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba spp.* *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 510-514 (2000).

Silvany, R.E.; Dougherty, J.M.; McCulley, J.P.; Wood, T.S.; Bowman, R.W. & Moore, M.B. The effect of currently available contact lens disinfection systems on *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga*. *Ophthalmology.* 97: 286-390 (1990).

Silvany, R.E., Dougherty, J.M. & McCulley, J.P. Effect of contact lens preservatives on *Acanthamoeba*. *Ophthalmology.* 98: 854-857 (1991).

Singh, B.N. A culture method for growing small free living amoebae and its bearing in the classification of the order amoebida. *Phil. Trans. R. Soc. London.* 165: 65-66 (1975).

Sison, J.P., Kemper, C.A., Loveless, M., McShane, D., Visvesvara, G.S. & Deresinski, S.C. Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1207-1216 (1995).

Slater, C.A., Sickel, J.Z., Visvesvara, G.S., Pabico, R.C. & Gaspari, A.A. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* 331: 85-87 (1994).

Sogin, M.L. Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Amer. Zool.* 29: 487-499 (1989).

Stehr-Green, J.K., Bailey, T.M., Brandt, F.H., Carr, J.H., Bond, W.W. & Visvesvara, G.S. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers. A case-control study. *JAMA.* 258: 57-60 (1987).

Stehr-Green, J.K., Bailey, T.M. & Visvesvara, G.S. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* 107: 331-336 (1989).

Steindel, M., Dias-Neto, E., Pinto, C.J., Grisard, E.C., Menezes, C.L, Murta, S.M., Simpson, A.J. & Romanha A.J. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:261-267 (1994).

Stern, G.A. & Buttross, M. Use of corticosteroids in combination with antimicrobial drugs in the treatment of infectious corneal disease. *Ophthalmology*. 98:847-853 (1991).

Stevens, A.R., De Jonckheere, J. & Wiliaert, E. *Naegleria lovaliensis* n. sp.: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *International Journal of Parasitology*. 10:51-64 (1980).

Stewart, G.L.; Kim, I.; Shupe, K.; Alizadeh, H.; Silvany, R.; McCulley, J.P. & Niederkorn, J.Y. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *J. Parasitol.* 78: 849-855 (1992).

Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J. Ledee, D.R., Rodríguez-Zaragoza, S., Dean, C. Fuerst, P.A. & Byers, T.J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Euk. Microbiol.* 45: 45-54 (1998).

Starford, M.P. & Griffiths. Variations in the properties and morphology of cyst of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gene. Microbiol.* 108: 33-37 (1978).

Szenasi, Z., Endo, T., Yagita, K. & Nagy, E. Isolation, identification and increasing importance of free-living amoebae, causing human disease. *J. Med. Micro.* 47: 45-54 (1998).

Tan, B., Weldon-Linne, C.M., Rhone, D.P., Penning, C.L & Visvesvara G.S.. *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117: 1043–1046 (1993).

Taylor, W.M., Pidherney, M.S., Alizadeh, H. & Niederkorn, J.Y. In vitro characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. *J. Parasitol.* 81: 603-609 (1995).

Thiele, D.L. & Lipsky, P.E. The action of leucyl-leucine methyl ester on cytotoxic lymphocytes requires uptake by a novel dipeptide-specific facilitated transport system and dipeptidyl peptidase I-mediated conversion to membranolytic products. *J. Exp. Med.* 172: 183-194 (1990).

Thomas K, Rutter A, Suller M, Harwood J, Lloyd D. Oxygen induces fatty acid (n-6)-desaturation independently of temperature in *Acanthamoeba castellanii*. *FEBS Lett.* 425: 171-174 (1998).

Thong, Y.H., Ferrante, A. & Shepard, C. Phagocytic behaviour towards baker's yeast distinguishes pathogenic from non pathogenic *Naegleria*. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73:684-687 (1978).

Tomlinson, G. Screening for chemical inhibitors of growth rate, encystment, and excystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Rev. Infect. Dis.* 5:S436-S437 (1991).

Toney D.M. & Marciano-Cabral F. Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. *J. Parasitol. Apr.* 84:338-44 (1998).

Turner, N.A., Biagini, G.A. & Lloyd D. Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157: 149-153 (1997).

Turner, N.A. Russell AD, Furr JR & Lloyd D. *Acanthamoeba spp.*, antimicrobial agents and contact lenses. *Sci. Prog.* 82: 1-8. (1999).

Turner, N.A. Russell AD, Furr JR & Lloyd D. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:27-34 (2000).

Tyndall, R.L. & Domingue, E.L. Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 954-959 (1982).

Van Klink, F.; Alizadeh, H.; Stewart, G.L.; Pidherney, M.S.; Silvany, R.E.; He, Y.; McCulley, J.P. & Niederkorn, J.Y. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. *Curr. Eye. Res.* 11: 1207-1220 (1992).

Van Klink, F., Alizadeh, H., He, Y., Mellon, J.A., Silvany, R.E., McCulley, J.P. & Niederkorn, J.Y. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 1937-1944 (1993).

Van Klink, F., Taylor, W.M., Alizadeh, H., Jager, M.J., Van Rooijen, N. & Niederkorn, J.Y. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 1271-1281 (1996).

Varga, J.H., Wolf, T.C., Jensen, H.G., Parmley, V.C. & Rowsey, J.J. Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin and polyhexamethylenebiguanide. *Am. J. Ophthalmol.* 115: 466-470 (1993).

Vesalouma, M., Kalso, M., Jokipii, L., Warhurst, D., Ponka, A. & Tervo, T. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers?. *Br. J. Ophthalmol.* 79: 178-181 (1995).

Visvesvara, G.S. & Balamuth, W. Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 22: 245-256 (1975).

Visvesvara, G.S. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 5: 369-372. (1991).

Visvesvara, G.S. & Stehr-Green, J.K. Epidemiology of free-living ameba infections. *J. Protozool.* 37: 25-33 (1990).

Vodkin, M.H., Howe, D.K., Visvesvara, G.S. & McLaughlin, G.L. Identification of *Acanthamoeba* at the and specific levels using the Polymerase Chain Reaction. *J. Protozool.* 39: 378-385 (1992).

Wang, X. & Ahearn, D.G. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 34: 212-215 (1997).

Weisman, R.A. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annu. Rev. Microbiol.* 30: 189-219 (1976).

Welsh, J. & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218 (1990).

Wiedmann-aAl-Ahmad, M., Tichy, H.V., & Schön, G. Characteritation of *Acinetobacter typi* strains and isolates obtained from wastewater treatment plant by PCR fingerprinting. *Appl. Environm. Microbiol.* 4066-4071 (1994).

Willaert, E. & Le Ray, D. Caractereses morphologique, biologues et immunochimiques de *Naegleria jadini* sp. nov. (amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica.* 9: 417-426 (1973).

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535 (1990).

Williams, J.G., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 218:704-740 (1993).

Winiecka-Krusnell, J. & Linder, E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 152: 613-619 (2001).

Wright, P.; Warhurst, D. & Jones, B.R. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. *Br. J. Ophthalmol.* 69:778-782 (1985).

Yagita, K. & Endo, T. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *Journal of Protozoology.* 37:570-575 (1990).

Yamasaki, Y. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/PCD3379/C/18.jpg>

Yang, X & Quiros, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86: 205-212 (1993).

Yang, Y.F., Matheson, M., Dart J.K.G. & Cree, I.A. Persistence of *Acanthamoeba* antigen following *Acanthamoeba* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* 85: 277-280 (2001).

Yang, Z., Cao, Z. & Panjwani, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: Carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infection and immunity.* 65: 439-445 (1997).

Young, J.D., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.C. & Cohn, Z.A. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 156: 1677-1690 (1982).

Yu, H.S., Hwang, M.Y., Kim, T.O., Yun, H.C., Kim, T.H., Kong, H.H., Chung, D.I. Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp. based on PCR-RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. *Korean J. Parasitol.* 37:181-188 (1999).

Yu, H.S., Choi, K.H., Kim, H.K., Kong, H.H. & Chung, D.I. Genetic analyses of *Acanthamoeba* isolates from contact lens storage cases of students in Seoul, Korea. *Korean J. Parasitol.* 39: 161-170 (2001).

Yu, K & Pauls, .K.P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic. Acids. Res.* 20: 2606 (1992).

Zanetti, S., Fiori, P.L., Pinna, A., Usai, S., Carta, F. & Fadda, G. Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions.. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 1596-1598 (1995).