

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

# ***AISLAMIENTO DE AMEBAS EN SUELO AGRÍCOLA DE CANARIAS***

Ángela Cruz Almeida

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

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

## **ÍNDICE:**

ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Estado actual del tema	4
2. Ciclo de vida y morfología de las AVL	5
3. Ecología	6
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
1. Material	7
1.1. Soluciones, reactivos y tampones	7
1.2. Medios de cultivo	7
1.3. Equipamiento	8
2. Aislamiento y cultivo de AVL	8
2.1. Elección de las zonas de muestreo	8
2.2. Toma de muestras	9
2.3. Siembra de muestras en placas de ANN	9
2.4. Aislamiento de AVL	9
2.5. Extracción de ADN genómico	10
2.6. Identificación mediante PCR	10
2.7. Genotipado de los aislados	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18

## **ABSTRACT:**

This bachelor thesis was carried out in the University Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands (IUETSPC), within the area of Parasitology.

The first observations of amoebae were simple descriptions and they were described as “formless cells” (Leidy, 1879). The term “amoeba” is used to describe those cells that move or feed by means of temporary projections called pseudopodia.

Free Living Amoebae (FLA) have been included, by the Center for Disease Control and Prevention (CDC, USA), in the group of emerging protozoa. This is due to their ability to live freely in the environment or in an endozoic way, forming a group of opportunistic pathogens with high relevance for both human and veterinarian health. Therefore and because of this dual capacity they are known as anafixic organisms (Page, 1967; Marciano – Cabral & Cabral, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004b; Visvesvara *et al.*, 2007).

FLA are a group of protozoa distributed worldwide in many habitats mainly water and soil related sources. Some members of FLA are able to act as opportunistic pathogens and environmental carriers of other pathogenic agents, such as bacteria and viruses.

In this study six soil samples and nine water samples were collected in the island of Fuerteventura in order to check the presence of FLA. The samples were cultured on 2% Non-Nutrient Agar (NNA) plates and checked daily for the presence of FLA.

FLA were observed in 2 of the 9 water samples (22.2%) and in all of the soil samples (100%).

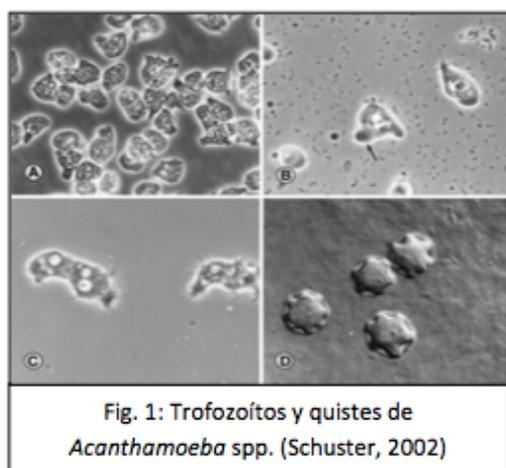
## INTRODUCCIÓN:

### 1. Estado actual del tema.

Las Amebas de Vida Libre (AVL) han sido englobadas, por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, EEUU), en el grupo de protozoos emergentes, debido a su creciente importancia como patógenos oportunistas.

Fue Culberston, en 1958, quien reportó por primera vez que las AVL eran potencialmente patógenas. Éstas eran capaces de producir efectos citopáticos en cultivos celulares e incluso *in vivo*. En ratones inoculados por vía intranasal o intracerebral se observaba que, tras pocos días de infección, se desarrollaba una meningoencefalitis mortal.

En la actualidad, existen cuatro grupos de AVL que han sido asociados con enfermedades en humanos y en animales: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinia pedata* (Figuras 1, 2, 3 y 4) (Visvesvara *et al.*, 2007; Qvarnstrom *et al.*, 2009); aunque también se han descrito casos de infecciones o coinfecciones relacionadas con la especie *Vermamoeba vermiformis* (Figura 5) (Smirnov *et al.*, 2011; Weekers *et al.*, 1994). Las patologías más comunes que causan estos parásitos son las encefalitis o meningoencefalitis, queratitis e infecciones que normalmente se manifiestan como lesiones cutáneas o infiltrados nasofaríngeos (Visvesvara *et al.*, 2007; Qvarnstrom *et al.*, 2009)



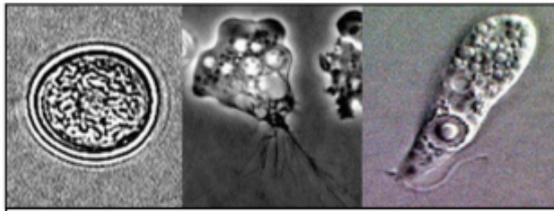


Fig. 3: Trofozoítos y quistes de *Naegleria fowleri* (Scientific American, August 17, 2011)

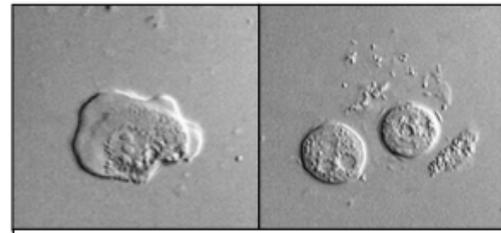


Fig. 4: Trofozoítos y quistes de *Sappinia pedata* (CDC)



Fig. 5: Trofozoítos y quistes de *Vermamoeba vermiformis* (Adaptado de Microworld y Micro\*Scope)

## 2. Ciclo de vida y morfología de las AVL

Las AVL se caracterizan por poseer un ciclo de vida simple con dos estadios bien diferenciados: el trofozoíto y el quiste (Figura 7). Dependiendo de la especie, la morfología de estas dos formas es muy variada, así como la movilidad del trofozoíto, que también puede presentar ciertas diferencias.

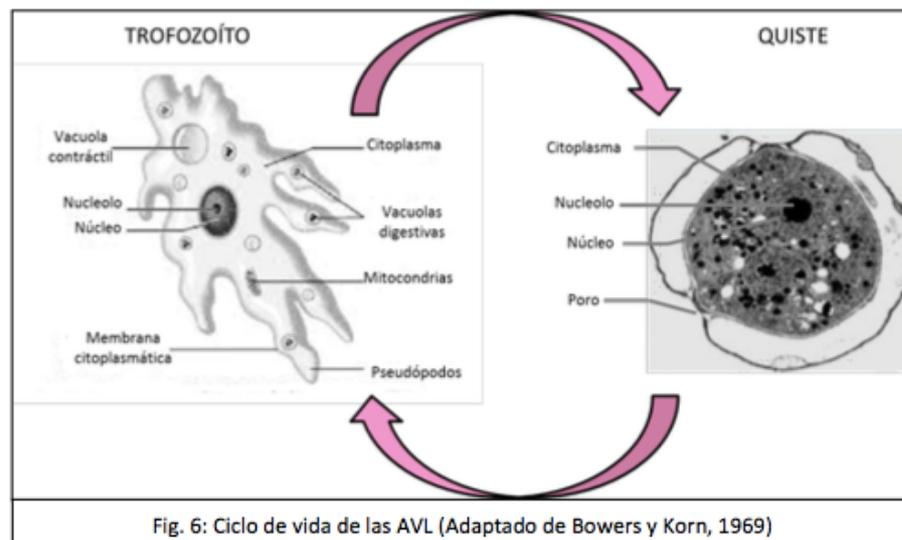


Fig. 6: Ciclo de vida de las AVL (Adaptado de Bowers y Korn, 1969)

El trofozoíto es conocido también como el estado vegetativo, con el que la ameba lleva a cabo las funciones de desplazamiento, nutrición y división. Cuando se produce una escasez de nutrientes (Neff *et al.*, 1964) o las condiciones ambientales se vuelven adversas (Cordingley *et al.*, 1996), las amebas pueden adoptar su forma quística, con

la que podrán soportar temperaturas extremas, condiciones de alta sequedad o tratamientos físico-químicos de desinfección (Lloyd *et al.*, 2001).

### **3. Ecología**

Las AVL, al ser organismos cosmopolitas capaces de colonizar una gran diversidad de ambientes aerobios, han generado mecanismos de adaptación para sobrevivir en amplios rangos de temperatura, salinidad y de pH. Tanto la termotolerancia como la osmotolerancia son factores que podrían determinar el potencial patógeno de una ameba, pero no son los únicos ni tampoco confirman que la ameba sea patógena (Schuster y Visvesvara, 2004a). Ejemplos de ello son las especies de los géneros *Paramoeba*, *Clydunelia*, *Platymoeba*, *Vexillifera*, *Flabellula* y *Mayorella*, capaces de sobrevivir en ambientes marinos, por lo que tienen tanto termo como osmotolerancia, y no son patógenas (Rodríguez-Zaragoza, 1994)

### **HIPÓTESIS:**

Debido al aumento en el número de casos diagnosticados en los últimos 50 años, las AVL han despertado un gran interés en la comunidad científica. Las mejoras en las técnicas de diagnóstico, así como el aumento de usuarios de lentes de contacto en el caso de *Acanthamoeba*, son factores determinantes en este incremento.

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que la presencia de AVL en el suelo favorece la formación de *biofilms* bacterianos, contribuyendo en el proceso de asimilación de determinados nutrientes y minerales por los vegetales presentes en el terreno.

### **OBJETIVOS:**

Ante la hipótesis propuesta, los objetivos de este Trabajo Final de Grado fueron los siguientes:

1. Detección de la presencia de AVL en seis suelos agrícolas de la isla de Fuerteventura.
2. Detección de la presencia de AVL en agua de riego utilizada en los suelos anteriormente mencionados.
3. Caracterización molecular de las muestras positivas para la presencia de AVL.

## MATERIAL Y MÉTODOS:

### 1. Material

#### 1.1. Soluciones, reactivos y tampones

- Kit de PCR AmpONE™ (GeneAll)
- Tampón TAE 50X: Tris – HCl 2 M pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8, ácido acético glacial 57,1 ml y H<sub>2</sub>O hasta 1 L.

#### 1.2. Medios de cultivo

ANN (Agar No Nutritivo): medio sólido utilizado para el aislamiento en cultivo de AVL.

- Bacto™ Agar (Difco, BD) 20g
- Agua destilada 1000ml

Autoclavar 121°C, 25 minutos y verter unos 15ml en placas de Petri para su solidificación.

PAS (Page's Amoeba Saline Solution, ATCC 1323): medio líquido utilizado para la recuperación de AVL a partir del ANN para su posterior extracción de ADN.

- Solución 1
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.142g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.136g
  - Agua destilada 500ml
- Solución 2
  - MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 4.0mg
  - CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 2.0mg
  - NaCl 0.120g

Autoclavar por separado 121°C, 25 minutos y dejar enfriar bien antes de mezclar.

### **1.3. Equipamiento**

- Espectrofotómetro DS – 11 DeNovix®.
- Fuente de alimentación de electroforesis Power Pak Basic (Biorad).
- Cubeta de electroforesis sumergida horizontal BioRad®.
- Microscopio invertido Leica DMIL (Leica).
- Microscopio óptico Leica DM 1000 (Leica).
- Rampa de filtrado PALL modelo N°15402.
- Termociclador Artik ThermalCycler (Thermo Scientific).
- Transiluminador para captura de imágenes: Chemi-Doc (Biorad) con el software ImageLab.
- Centrífuga UV3 H1-15PK refrigerada (Sigma).

## **2. Aislamiento y cultivo de AVL**

### **2.1. Elección de las zonas de muestreo**

El objetivo del trabajo se basa en el estudio de la presencia de AVL potencialmente patógenas en suelos agrícolas del archipiélago canario. Se considera importante conocer las poblaciones amebianas presentes en los suelos agrícolas de nuestra comunidad autónoma para así hacer frente a posibles patologías. Esto se debe a que las AVL no solo generan enfermedades por sí mismas sino que además son capaces de transportar otros microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus.

Los suelos objeto de estudio de nuestro trabajo pertenecen a una parcela de experimentación en la isla de Fuerteventura (Figura 7). Las muestras se tomaron a dos profundidades diferentes: de 0 a 5 metros y de 5 a 10 metros de profundidad. La parcela estaba dividida en distintos sectores, los cuales eran regados por los distintos tipos de agua que también hemos analizado.



Fig. 7: Parcela de experimentación en la isla de Fuerteventura.

## 2.2. Toma de muestras

Para las muestras de suelos se llenaron, con tierra, tubos estériles de 15 ml.

Por otro lado, las muestras de agua se tomaron en tubos estériles de 50 ml.

Todas las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de su procesamiento.

## 2.3. Siembra de muestras en placas de ANN

De los suelos se tomaron aproximadamente 5 gramos de cada muestra y fueron sembrados en placas de ANN al 2% formando una estría longitudinal en el centro de la placa, ayudándonos de una espátula. Por otro lado, las muestras de agua se sometieron a un proceso de filtración al vacío utilizando membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , suficiente para retener las amebas. Dicha membrana se sembraba boca abajo en una placa de ANN al 2%.

Todas estas operaciones fueron realizadas en condiciones de esterilidad, las placas se sellaron con PARAFILM<sup>®</sup>M (Sigma-Aldrich) y se incubaron entre 25°C y 30°C.

## 2.4. Aislamiento de AVL

Las placas de ANN fueron monitorizadas diariamente con un microscopio óptico invertido Leica DMIL para localizar zonas donde existieran trofozoítos o quistes de AVL. Cuando se encontraban estas zonas, comenzaba el aislamiento de AVL

mediante clonaje. El clonaje consiste en recortar la zona de agar donde se encuentran las amebas y sembrarla boca abajo en una nueva placa de ANN. Es importante repetir este proceso hasta que consigamos una placa en la que solo exista un tipo de AVL, sin bacterias ni hongos.

## 2.5. Extracción de ADN genómico

Para la identificación molecular de los aislados obtenidos se usó el kit de purificación y extracción de ADN Maxwell<sup>®</sup> 16 según el manual N° TM284 (Promega). Las placas eran lavadas con 4 ml de medio PAS y el contenido era centrifugado para su concentración. De 1 a 2 ml del cultivo fueron introducidos directamente en los cartuchos del kit, uno para cada muestra, y se programó el dispositivo de extracción. El ADN queda recogido en unas columnas de elución y posteriormente se cuantifica usando el espectrofotómetro DS – 11 DeNovix<sup>®</sup>. Una vez realizado esto, las muestras se almacenan a -20°C para su posterior caracterización molecular.

## 2.6. Identificación mediante PCR

Con el objetivo de determinar a nivel molecular las AVL encontradas en las distintas muestras de suelo, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Artik ThermalCycler (Thermo Scientific): para un volumen final de 50 µl se utilizaron 5 µmol de cada cebador, entre 40 y 100 ng de DNA de AVL y 0,25 unidades de Taq polimerasa. Se usaron los cebadores universales para AVL:

- Universales gen 18S rDNA de Amebas de Vida Libre (Tsvetkova *et al.*, 2004)
  - FLA-F: 5' – CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC – 3'
  - FLA-R: 3' – CAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTAAC – 5'

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

- *Acanthamoeba* spp. (Schroeder *et al.*, 2001)
  - JDP1: 5' – GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA – 3'
  - JDP2:3' – TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA – 5'

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

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y detectados mediante radiación UV en el transiluminador para captura de imágenes: Chemi-Doc (Biorad) con el software ImageLab.

## 2.7. Genotipado de los aislados

La determinación del genotipo de las muestras positivas para AVL se basa en el análisis de la secuencia del fragmento del ARNr 18S, como ha sido descrito previamente (Booton *et al.*, 2002; Corsaro y Venditti, 2010)

Las condiciones de la PCR para la secuenciación de ADN de las diferentes AVL aisladas siguieron el mismo patrón que las utilizadas para su amplificación. La secuenciación fue realizada en la empresa Macrogen, Spain (Madrid) y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las ya disponibles en el GenBank (NCBI) para establecer el género y especie de los nuevos aislados. El software utilizado para dicho análisis fue el ChromasPro y el MEGA 5.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

De los 6 suelos analizados se detectó la presencia de AVL en todos ellos (100%), mientras que de las 9 muestras de agua procesadas solo fueron positivas para AVL 2 de ellas (22,2%).

Código muestra	Origen muestra	Profundidad de muestreo (m)	Detección en cultivo	Detección por PCR	Género/Especie
SAF1a	Suelo	0-5	+	-	<i>Acanthamoeba</i> spp. (Figura 8)
SAF1b	Suelo	5-10	+	-	<i>Vermamoeba vermiformis</i> (Figura 9)
SAF2a	Suelo	0-5	+	-	<i>Thecamoeba</i> spp.(Figura 10) AVL no determinada (Figura 11)

Código muestra	Origen muestra	Profundidad de muestreo (m)	Detección en cultivo	Detección por PCR	Género/Especie
SAF2b	Suelo	5-10	+	+	<i>Acanthamoeba palestinensis</i> (genotipo T2)
SAF3a	Suelo	0-5	+	-	<i>Thecamoeba</i> spp.(Figura 12)
SAF3b	Suelo	5-10	+	-	<i>Acanthamoeba</i> spp.(Figura 13)
ARF1	Agua depurada	N/A	+	+	<i>Vermamoeba vermiformis</i>
ARF2	Agua desalada	N/A	-	-	N/A
ARF3	Agua salina	N/A	-	-	N/A
ARF4	Agua depurada	N/A	+	+	FLA: <i>Vermamoeba vermiformis</i>
ARF5	Agua desalada	N/A	-	-	N/A
ARF6	Agua salina	N/A	-	-	N/A
ARF7	Agua depurada	N/A	-	-	N/A
ARF8	Agua desalada	N/A	-	-	N/A
ARF9	Agua salina	N/A	-	-	N/A

SAF: Suelo Agrícola de Fuerteventura; a: profundidad de 0 a 5 metros; b: profundidad de 5 a 10 metros; ARF: Agua de Riego de Fuerteventura; N/A: No Aplica

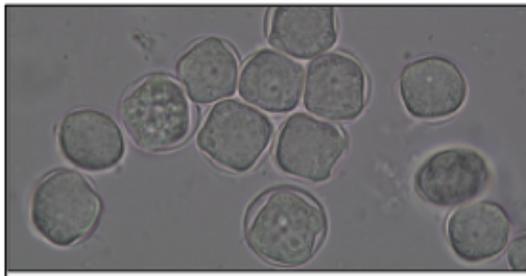


Fig. 8A: SAF1a quistes de *Acanthamoeba* spp.



Fig. 8B: SAF1a trofozoíto de *Acanthamoeba* spp.

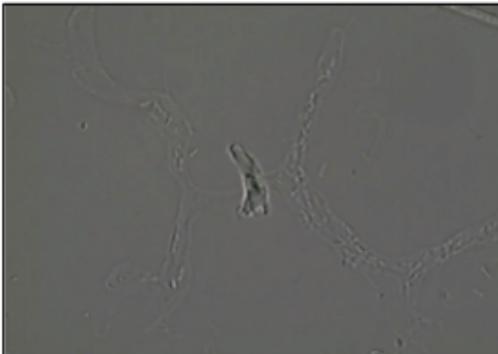


Fig. 9: SAF1b trofozoíto de *Vermamoeba vermiformis*

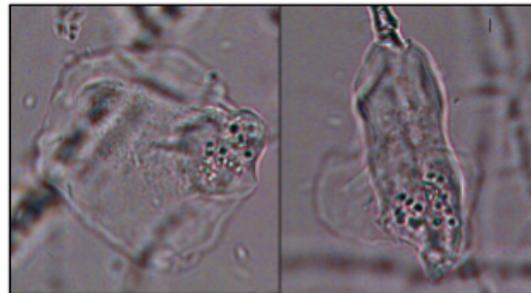


Fig. 10: SAF2a trofozoíto de *Thecamoeba* spp.

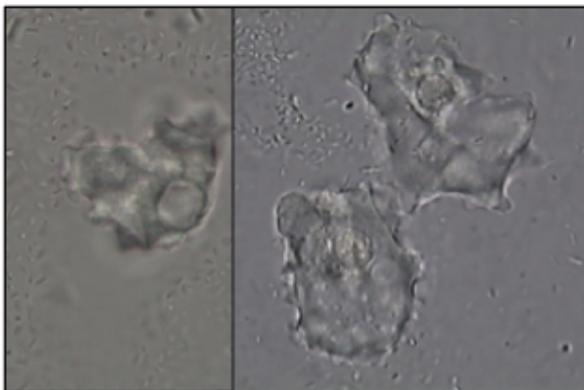


Fig. 11: SAF2a AVL no identificada



Fig. 12: SAF3a trofozoíto de *Thecamoeba* spp.



Fig. 13A: SAF3b quistes de *Acanthamoeba* spp.

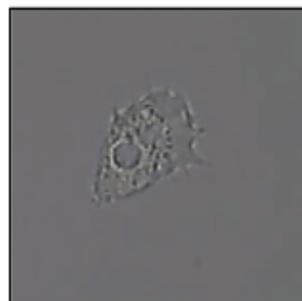


Fig. 13B: SAF3b trofozoíto de *Acanthamoeba* spp.

En el suelo podemos encontrar tanto protozoos, como otros microorganismos y animales, localizados en biofilms acuáticos, formando agregados o en el interior de los poros que forma el terreno. Estos organismos contribuyen en el proceso de asimilación de nutrientes y minerales por parte de los vegetales. Dentro de los protozoos, las amebas son las que consumen el 60% de la población del suelo (Siddiqui y Khan, 2012). Procariotas como las bacterias son conocidos se encargan directamente de la materia orgánica, pero resultan ineficientes a la hora de liberar los minerales al medio. Este papel lo desempeñan de una manera más eficaz las amebas que consumen bacterias liberando los minerales al medio en forma de desechos (Siddiqui y Khan, 2012). En consecuencia, otro papel muy importante llevado a cabo por las amebas es la reducción de la competición por los nutrientes en el suelo (Clarholm, 1981; Bamforth, 1985; Rodríguez – Zaragoza, 1994; Molmeret *et al.*, 2005).

Gracias a su forma ameboide, las amebas pueden emitir pseudópodos y deformar su estructura celular para conseguir nutrientes en poros del suelo y lugares inaccesibles para otros microorganismos (Young and Ritz, 2000). Según Zahn *et al.*, 2016, el número de AVL en el suelo y su capacidad para adquirir la forma necesaria para llegar a los nutrientes más inaccesibles depende directamente del aumento de la población bacteriana. Cuanto menor sea la disponibilidad de nutrientes en el suelo, es decir, cuanto mayor sea la población bacteriana, la capacidad de deformarse de las AVL se verá aumentada, para conseguir los nutrientes que sean más inaccesibles para el resto de la comunidad microbiana en el suelo.

En un estudio paralelo llevado a cabo en el laboratorio de AVL en el IUETSPC, se ha estudiado la carga bacteriana de las aguas analizadas en este trabajo. En las dos aguas depuradas positivas para AVL se detectó la presencia de bacterias pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*, así como microorganismos coliformes. Con estos datos, sumados a los de nuestro trabajo, queda demostrada la relación que existe entre protozoos y bacterias potencialmente patógenas en los suelos de Fuerteventura objeto de estudio.

Entre las muestras estudiadas se ha detectado la presencia del género *Acanthamoeba*, el cual ha despertado un gran interés en la comunidad científica en los últimos años debido a su capacidad para producir importantes infecciones en humanos y otros animales (Van der Lugt *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1997; Kinde *et al.*, 2007;

Sidiqui y Khan, 2012; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013; Valladares *et al.*, 2015). Las principales enfermedades que producen son: encefalitis granulomatosa amebiana (EGA), lesiones cutáneas y queratitis. En la mayoría de los casos, las infecciones se producen en pacientes inmunocomprometidos o en usuarios de lentes de contacto, lo cual es un factor de riesgo para el desarrollo de queratitis. Actualmente el número de casos diagnosticados de queratitis por *Acanthamoeba* aumenta de manera exponencial, tanto por la mejora en los métodos de diagnóstico como por el aumento de usuarios de lentes de contacto (Sidiqui y Khan, 2012).

Este género incluye tanto especies patógenas como no patógenas, las cuales se clasifican en 22 genotipos diferentes que van desde el T1 al T22 (Schroeder *et al.*, 2001; Tice *et al.*, 2016). El genotipo T4 es al que pertenecen los aislados causantes de la mayoría de las infecciones en humanos. Más del 90% de los casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. están ligados con este genotipo (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Además, este genotipo es también el causante de la mayoría de las infecciones cutáneas o de los casos de las EGA (Booton *et al.*, 2005; Maghsood *et al.*, 2005)

Por otro lado, en este trabajo se ha detectado la presencia de *Vermamoeba vermiformis*, tanto en muestras de suelo como de agua. Esta especie se encontraba inicialmente dentro del género *Hartmannella*, que comparte orden con los géneros *Acanthamoeba* y *Balamuthia*. Debido a numerosas diferencias a nivel morfológico y molecular, en 2011, Smirnov y colaboradores describieron la especie *Vermamoeba vermiformis*, dentro del género *Vermamoeba* y la familia Vermamoebidae. Este género engloba a una única especie, la cual se ha descrito en numerosos trabajos como termotolerante, lo cual es uno de los factores a tener en cuenta para calificar a una ameba como potencialmente patógena (Page, 1977; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007). La especie *V. vermiformis* no ha sido estudiada tan profundamente como otras AVL debido a su baja patogenicidad en humanos. Aún así, han sido publicados casos de queratitis en usuarios de lentes de contacto en los que *V. vermiformis* se presenta coinfectando la córnea de pacientes con otras AVL de los géneros *Acanthamoeba* (De Jonckheere y Brown, 1998) y *Vahlkampfia* (Aitken *et al.*, 1996), y con la bacteria productora de queratitis *Pseudomonas* (Sharma *et al.*, 2013). Además, esta especie tiene relevancia médica debido a su papel como vehículos potenciales de bacterias patógenas (Horn *et al.*, 2000; Cabello – Vílchez *et al.*, 2014).

En dos de los suelos, y en las secciones más superficiales, también fue detectada la presencia del género *Thecamoeba*. Este género no ha sido reportado hasta ahora como patógeno. Es una de las AVL más frecuentes en muestras de suelo y presenta la peculiaridad de no ser capaz de formar quistes. El tamaño de su trofozoíto oscila entre 80 y 130  $\mu\text{m}$  y presenta en su superficie pliegues longitudinales (Page, 1988).

## CONCLUSIONES:

1. Se ha detectado la presencia de diferentes AVL en suelos agrícolas pertenecientes a una parcela de experimentación en la isla de Fuerteventura.
2. *Vermamoeba vermiformis* ha sido aislada a partir de muestras de agua depurada utilizada para el riego de la parcela de experimentación.
3. Especies del género *Thecamoeba* han sido detectadas a nivel morfológico en los suelos SAF2a y SAF3a.
4. *Acanthamoeba* spp. es el género de AVL identificado con mayor frecuencia en las muestras analizadas.

## BIBLIOGRAFÍA:

A

**Aitken** D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV (1996). Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology*. 103(3): 485 – 494.

B

**Bamforth** SS (1985). Symposium on “Protozoan Ecology”: the role of protozoa in litters and soils. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 32(3): 404 – 409.

**Booton** GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA (2005). Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(4): 1689 – 1693.

**Bowers** B y Korn ED (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *The Journal of Cell Biology*. 41(3): 786 – 805.

C

**Cabello – Vélchez** AM, Reyes – Batlle M, Montalbán – Sandoval E, Martín – Navarro CM, López – Arencibia A, Elias – Letts R, Guerra H, Gotuzzo E, Martínez – Carretero E, Piñero JE, Maciver SK, Valladares B, Lorenzo – Morales J (2014). The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. *Parasitology Research*. 113 (7): 2509 – 2513.

**Clarholm** M (1981). Protozoan grazing of bacteria in soil – impact and importance *Microbial Ecology*. 7(4):343 – 350.

**Cordingley** JS Wills RA, Villemez CL (1996). Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 61: 167 – 171.

**Culbertson** CG, Smith JW, Minner JR (1958). *Acanthamoeba*: observation on animal pathogenicity. *Science*. 127(3313): 1506.

D

**De Jonckheere** JF, Brown S (1998). Is the free living ameba *Hartmannella* causing keratitis? *Clinical Infectious Diseases*. 27(5): 1337 – 1338.

## K

**Kinde** H, Read DH, Daft BM, Manzer M, Nordhausen RW, Kelly DJ, Fuerst PA, Booton G, Visvesvara GS (2007). Infections caused by pathogenic free – living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19: 317 – 322.

## L

**Leydy** J (1879). Fresh – Water Rhizopods of North America. *Report of the United States Geological Survey of the Territories*. Volimen XII.

**Lloyd** D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR, Russell AD (2001). Encystation on *Acanthamoeba castellanii*: Development of Biocide Resistance. *Eukaryotic Microbiology*. 1(48): 11 – 16.

**Lorenzo – Morales** J, Martínez – Carretero E, Batista N, Alvarez – Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B (2007). Early diagnosis of amoebic keratitis due to mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitology Research*. 102(1): 167 – 169.

**Lorenzo – Morales** J, Valladares M, Sancho J, Reyes – Batlle M; Martín – Navarro CM, Lopez – Arencibia A, Gonzalez AC, Lopez – Medina L, Piñero JE, Martinez – Carretero E, Valladares B (2013). First report of a case of prostatitis due to *Acanthamoeba* in a dog. *Acta Protozoologica*. 52: 325 – 329.

**Lorenzo – Morales** J, Khan NA, Walochnik J (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 22:10.

## M

**Marciano – Cabral** F, Cabral G (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2): 273 – 307.

**Molmeret** M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(1): 20 – 28.

## N

**Neff** RJ, Ray SA, Benton WF, Wilborn M (1964). Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. *Methods in Cell Physiology*, 1: 55 – 83. D.M. Ed. Prescott, Academic Preess, New York.

## P

**Page** FC (1967). Re – definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *Journal of Protozoology*. 14(4): 709 – 724.

**Page** FC (1976). An illustrated key to freshwater and soil amoebae. Scientific publication n°.34. Freshwater Biological Association, Kendal, Cumberland, United Kingdom.

**Page** FC (1988). A new key to fresh water and soil *Gymnamoeba*. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK*. 122pp.

## Q

**Qvarnstrom** Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS (2009). Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal Infection Diseases*. 199(8): 1139 – 1142.

## R

**Rodriguez – Zaragoza** S (1994). Ecology of Free – Living Amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*. 20(3): 225 – 224.

## S

**Schuster** FL (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free – living amoebas. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(3): 342 – 354.

**Schuster** FL y Visvesvara GS (2004a). Free – living amoebae as opportunistic and non – opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34(9): 1001 – 1027.

**Schuster** FL y Visvesvara GS (2004b). Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*. 126(1- 2): 91 – 120.

**Sharma R**, Jhanji V, Satpathy G, Sharma N, Khokhar S, Agarwal T (2013). Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens – associated keratitis. *Optometry and Vision Science Journal*. 90(2): 53 – 55.

**Siddiqui R** y Khan NA (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*. 5: 6.

**Smirnov A**, Chao E, Nasonova E, Cavalier – Smith T (2011). Revised classification of non – mycetozoon naked lobose amoebae (Amoebozoa). *Protist*. 162(4): 545 – 570.

## T

**Taylor PW** (1997). Isolation and experimental infection of free – living amoebae in freshwater fishes. *Journal of Parasitology*. 63: 232 – 7.

**Tice AK**, Shadwick LL, Fiore – Donno AM, Geisen S, Kang S, Schuler GA, Spiegel FW, Wilkinson KA, Bonkowski M, Dumack K, Lahr DJ, Voelcker E, ClauB S, Zhand J, Brown MW (2016). Expansion of the molecular and morphological diversity of *Acanthamoebidae* (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biol Direct* 11: 69.

## V

**Valladares M**, Reyes – Batlle M, Martín – Navarro CM, López Arencibia A, Dorta – Gorrín A, Wagner C, Martínez – Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo – Morales J (2015). Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Archives of microbiology*. 197(5): 639 – 643.

**Vand der Lugt JJ**, Van der Merwe HE (1990). Amoebic meningoencephalitis in a sheep. *Journal of the South African Veterinary Association*. 61: 33 – 36.

**Visvesvara GS**, Moura H, Schuster FL (2007). Pathogenic and opportunistic free – living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology Medicine Microbiology*. 50(1): 1 – 26.

## W

**Weekers** PH, Gast RJ, Fuerst PA, Byers TJ (1994). Sequence variation in small subunit ribosomal RNAs of *Hartmannella vermiformis* and their phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*. 11(4): 684 – 690.

Y

**Young** I Ritz K (2000). Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil and Tillage Research*. 53 (3 – 4): 201 – 213.

Z

**Zahn** G, Wagai R, Yonemura S. (2016). The effects of amoebal bacterivory on carbon and nitrogen dynamics depend on temperature and soil structure interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 94: 133e137