

Revista BIOCYT es editada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

DETECTION OF PATHOGENIC AMOEBAE OF THE GENUS
ACANTHAMOEBA BY PCR IN RECREATIONAL WATER BODIES IN THE
STATE OF SAN LUIS POTOSI, MEXICO

DETECCIÓN DE AMIBAS PATÓGENAS DEL GÉNERO *ACANTHAMOEBA*
POR PCR EN CUERPOS DE AGUA RECREATIVOS EN EL ESTADO DE SAN
LUIS POTOSÍ, MÉXICO

^{1,1}Ortíz Ortega Ricardo, ^{2,1}Patricia Bonilla Lemus, ^{3,2}Alejandro Monsalvo Reyes y
^{4,3}Carlos Eslava Campos

¹Proyecto CyMA. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM. Av. De los Barrios No. 1,
Col. los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C.P. 54090.

²Laboratorio de Análisis y Química de ADN UNAM. Av. De los Barrios No. 1, Col. Los Reyes
Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C.P. 54090.

³Laboratorio de Investigación del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina,
UNAM. Edif. B 6° piso, Ciudad Universitaria, Copilco el Alto, Delegación Coyoacán, C.P. 04510.

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) of the genera *Acanthamoeba* can cause severe infections to man like Granulomatous encephalitis amoebic (GAE) and Amoebic Keratitis (AK). The main problem in the detection of FLA in environment and patients, by traditional methods is the time to identify them, that on average it takes three weeks. Because of this, it is necessary to implement modern and reliable methodologies. The objective of this research was to determine the presence of pathogenic *Acanthamoeba* in springs, waterfalls, natural ponds and swimming pools supplied with thermal waters in the Huasteca Potosina, Mexico.

Key words: free-living amoebae, *Acanthamoeba*, PCR

Correspondence to author

^{1,1} ricort@unam.mx

^{2,1} blemus@unam.mx

^{3,2} reyesac2001@gmail.com

^{4,3} eslava@servidor.unam.mx

Seventy four water samples were collected by duplicate; the samples were processed by conventional laboratory methods (culture and morphological identification) and by the PCR technique, using the primer Ac6 de 195-pb. The PCR technique was adequate for identification of pathogenic strains of *Acanthamoeba* genus from the environment. The presence of *Acanthamoeba* genus in the water bodies studied represents a potential risk for public health.

RESUMEN

Entre las amibas de vida libre (AVL) se encuentra el género *Acanthamoeba* con algunas especies que pueden causar infecciones severas al hombre como la Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) y la Queratitis Amibiana (QA). El principal problema en la detección de las AVL, tanto del ambiente como de individuos infectados es el tiempo para identificarlas, que en promedio es de tres semanas. Debido a lo anterior, es necesario implementar metodologías modernas y confiables. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* de cuerpos de agua de manantiales, casadas, lagunas naturales y piscinas alimentadas con aguas termales en la Huasteca Potosina, México, utilizando el método tradicional, así como la técnica de PCR. Se colectaron 74 muestras por duplicado, 74 se procesaron por los métodos convencionales para detectar organismos pertenecientes al género *Acanthamoeba*, el resto se analizaron por la técnica de PCR, usando el iniciador Ac6 de 195-pb. La técnica de PCR, resultó adecuada para la identificación de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* del ambiente. La presencia de amibas del género *Acanthamoeba* en los cuerpos de agua estudiados, representa un riesgo potencial de salud pública.

Palabras clave: Amibas de vida libre, *Acanthamoeba*, PCR

INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL), se encuentran en todo tipo de ambiente, ya que ocupan un lugar importante en la cadena alimentaria de las comunidades naturales del agua y el suelo, y aunque no puede considerarse como un hábitat, también se han encontrado en el aire (Rivera et al., 1987; Rivera et al., 1988; Lares-Villa, 2001).

A este grupo de protozoarios, también se les conoce como amibas "anfizoicas", debido a la dualidad biológica que presentan, ya que además de ser de vida libre (Martínez y Visvesvara, 1997), algunas especies pueden manifestarse como parásitos del sistema nervioso central (SNC), del tejido corneal, (Kilvington, 1990) vaginal y prostático en el humano y algunos animales (Martínez, 1993), este grupo lo conforman los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, (Visvesvara, 1993; Méndez, 1996) y *Sappinia* (Qvarnstrom, 2009) y probablemente *Hartmannella* (Centeno, 1996).

Las AVL patógenas han adquirido interés debido a que pueden producir patologías severas que incluso, pueden ocasionar la muerte (Martínez y Visvesvara, 1997; Visvesvara, et al., 2007). Las AVL patógenas provocan en el hombre meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) o naegleriosis y la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o acanthamebosis; ambos trastornos son de naturaleza fatal y difieren en agente etiológico, patogenicidad, sitios de daño, curso y manifestaciones clínicas (John, 1993). También pueden causar queratitis amibiana (QA), daño en el tejido corneal, en el tejido vaginal y prostático humano (Kilvington, 1990; Martínez, 1993; Bonilla, 2011). Los reportes a nivel mundial demuestran que podrían constituirse en un

verdadero problema de salud pública, por lo que deben ser tomadas en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales, ya que pueden tener consecuencias graves para la comunidad, aunado a que los tratamientos para erradicarlas no han resultado ser efectivos en la mayoría de los casos (Martínez y Visvesvara, 1997). Junto con el desconocimiento entre el personal biomédico sobre las enfermedades que causan estos organismos, se encuentra la falta de métodos de identificación que sean rápidos, precisos y confiables. De ahí, la importancia de desarrollar métodos de identificación de AVL patógenas basados en técnicas modernas como lo es el caso de la técnica de PCR, tanto para identificarlas de casos clínicos, como del ambiente donde se desarrollan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante un ciclo anual se realizaron cuatro muestreos en nueve sitios a lo largo de la Huasteca en el estado de San Luis Potosí, como manantiales, cascadas, lagunas, y piscinas alimentadas con aguas termales. Se recolectaron 74 muestras por duplicado en frascos estériles de polipropileno de 1 L. Se conservaron a temperatura ambiente durante su transporte al laboratorio.

El primer grupo de muestras se filtró con membrana Millipore de 8 μm las cuales se colocaron en cajas de Petri que contenían medio NNE y se incubaron a 37° C (De Jonckheere, 1997; Page, 1998), el segundo grupo (duplicado), también se filtró con membrana Millipore de 8 μm , la membrana se colocó en un tubo de centrifuga estéril y se adicionaron 5 mL de solución SET (sacarosa EDTA), inmediatamente después de la filtración, se resuspendió por agitación directa, retirándose la membrana y congelando la suspensión a -20 °C hasta el momento en que se realizó la extracción del ADN (Innis et al., 1990). Todo lo anterior se realizó bajo condiciones de esterilidad.

Del primer grupo se retiraron las membranas del medio NNE y se observaron con el microscopio invertido para localizar las zonas de crecimiento amibiano, las cuales se transfirieron a cajas con NNE nuevo y se incubaron a la temperatura a la que crecieron previamente (37 °C).

De los cultivos monoaxénicos (NNE), se localizaron zonas con crecimiento amibiano y se transfirieron a los medios axénicos PBSGM (modificado) y Bactocasitona (BC) al 2%, con 10% de suero fetal de bovino y se incubaron a 30 °C (Cerva, 1973; Page, 1998).

La identificación morfológica de *Acanthamoeba* se llevó a cabo realizando preparaciones *in vivo* de cultivos axénicos y usando las claves taxonómicas de Pussard y Pons (1977) y Page (1998).

Se realizó la prueba de tolerancia a la temperatura, para lo cual cada uno de los aislamientos se sembró por cuatriplicado en medio NNE y se incubaron durante una semana a temperatura ambiente (20-22 °C), 37, 42 y 45 °C (Page, 1998).

Prueba de patogenicidad

Se realizó en grupos de cinco ratones *Mus musculus* Linnaeus, 1758 machos de la cepa CD-1, de tres semanas de edad. La inoculación se realizó por vía intracerebral y por instilación nasal. Los trofozoítos de cultivo axénico se ajustaron a una cuenta de 1×10^3 - 1×10^6 /mL. El volumen inoculado fue de 20 μL . La inoculación intracerebral se realizó a través de la articulación interparietal (Cerva, 1967). En la inoculación nasal, se aplicó la misma dosis a

través de los orificios nasales del ratón. Los ratones se observaron durante 21 días, registrando los cambios en su comportamiento. Los aislamientos amibianos se consideran patógenos cuando la mortalidad de ratones es igual o mayor al 60% (Cerva, 1967). Los organismos que sobrevivieron los 21 días, al igual que el grupo control, se sacrificaron y se les extrajo el cerebro, pulmones, hígado y riñones y se colocaron en medio NNE y se incubaron a 30 °C, con el fin de determinar si existió desarrollo amibiano en esos órganos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La extracción del ADN de todas las cepas se realizó por el método de fenol cloroformo (Kowalchuk et al., 2004). Se utilizaron los iniciadores (primers) reportados en European Microbiology Laboratory, Gene Bank y la Base de Datos de Secuencias de Nucleótidos (DDBJ) (Vodkin et al., 1992). La amplificación se realizó para el iniciador Ac6 de 195-pb, Ac6/10.forward primer (5'- GGC GAA GAA CCT GCA TCA GC-3') y Ac6/210, reverse primer (5'- CAA CCA ACT CCC GAG CCA -3'), que identifica especies patógenas de *Acanthamoeba* (Vodkin et al., 1992; Howe et al., 1997; Lehmann et al., 1998). Como controles negativos se utilizaron cepas de referencia no patógenas de *Acanthamoeba castellanii* (Neff) y *Acanthamoeba lenticulata* (PD2) y como controles positivos *A. castellanii* (AC), *Acanthamoeba culbertsoni* (Lilly A- 1), *Acanthamoeba polyphaga* (PQ) y *Acanthamoeba lugdunensis* (SH-565), del catálogo de cepas del American Type Culture Collection (ATCC).

El PCR se realizó en 50 µL volumen final. Para cada reacción se utilizaron 100 ng de ADN total. El buffer de reacción contenía 20 mM tris HCL (pH 8), 2.5 mM MgCl₂ y 0.2 mM dNTPs (Gene Amp PCR Reagent Kit, Perkin Elmer), 2.5 unidades de la polimerasa de DNA Taq (Ampli Taq ADN Polymerase, Perkin Elmer) y 0.5 µmol de cada uno de los iniciadores. La mezcla se colocó en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR Sytem 2400), con una desnaturalización inicial por un minuto a 95°C seguido de 30 ciclos de desnaturalización (un minuto a 94°C) alineamiento (un minuto a 64°C) y extensión (un minuto a 72°C). La reacción se terminó con una extensión de un paso por cinco minutos a 72°C, almacenándose a 4°C.

Posterior a la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2% en amortiguador TBE (0.5 X) y se corrió a 60 voltios, utilizando dos marcadores de peso molecular de 100 pb el primero y el segundo marcador f X174 RF DNA/Hae III.

RESULTADOS

De las 74 muestras de agua procesadas por el método tradicional se obtuvieron 39 aislados del género *Acanthamoeba* en siete de los nueve cuerpos de agua analizados. La mayoría de los aislamientos de *Acanthamoeba* (71%) se obtuvo de las albercas de los centros recreativos, alimentadas con aguas termales. De éstos el 30.7% corresponden al Bañito, 25.6% al Gogorrón y el 15.3% al balneario Taninul. De acuerdo con las pruebas de patogenicidad, el 87.1 % (de estos tres balnearios) fueron patógenas en ratón.

En las muestras de agua donde se obtuvieron aislamientos del género *Acanthamoeba* por el método tradicional, en el 76.92 % se detectó amplicón para el iniciador Ac6, es decir se identificó ADN de amibas patógenas del género *Acanthamoeba*. En la figura 1 se muestran algunas de las pruebas realizadas durante el estudio.

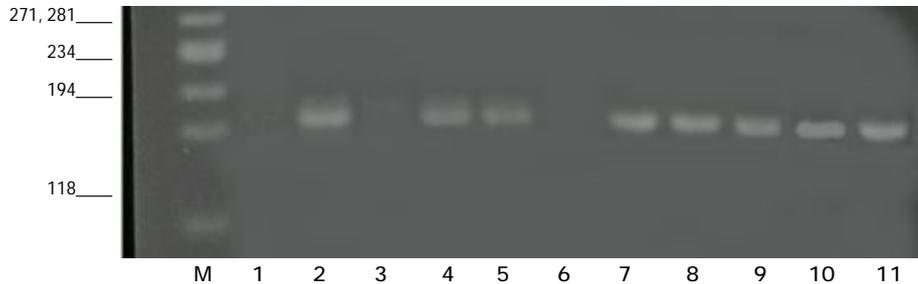


Fig. 1. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6 de las cepas de referencia y de muestras de agua obtenidas del Bañito y del Gogorrón. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1 blanco, control negativo; 2 *A. castellanii* (AC) control positivo; 3 *A. lenticulata* (PD₂) control negativo; 4-5 *A. culbertsoni* (Lilly A-1) y *A. polyphaga* (PQ) control positivo, 6 *A. castellanii* (Neff) control negativo, 7-9 muestras del Bañito (Ba 1(1), Ba 2(1), Ba 3(1)) y 10-11 muestras del Gogorrón (Go 1(1) y Go 2(1))

DISCUSIÓN

Las AVL son habitantes comunes en el suelo y agua (Sleigh, 1989). En los medios acuáticos viven adheridas a partículas flotantes, en sedimentos y en menor cantidad en la columna de agua (Kyle y Noblet, 1986).

El mayor número de aislamientos de *Acanthamoeba* (28) se obtuvo de las albercas de los tres sistemas recreacionales (El Bañito, Taninul y El Gogorrón) y aunque el flujo es continuo, ya que son alimentadas directamente de manantiales de aguas termales, temporalmente el agua está confinada en las albercas por lo que tales estructuras permiten que existan zonas (paredes y esquinas) donde se estanca el agua y se acumula materia orgánica. Estas condiciones favorecen la presencia de microhábitats, en donde las AVL encuentran un medio muy favorable ya que están relativamente protegidas, y al mismo tiempo tienen suficiente alimento, oxígeno, bacterias, materia orgánica y la temperatura adecuada. Además, como es agua que fluye constantemente, no se le agrega ningún desinfectante (Bonilla, et al., 2000).

El 87.1% de los aislamientos del género *Acanthamoeba* fueron patógenas en ratón, lo cual significa que son potencialmente patógenas para el hombre, esto es importante desde el punto de vista de salud pública, ya que representa un importante factor de riesgo para los usuarios, especialmente para los que presentan algún tipo de inmunosupresión (Martínez y Visvesvara, 1997; Khan, 2006).

No obstante, en la literatura se encuentran reportes de EAG sin que exista inmunosupresión, en donde se afirma que la puerta de entrada es el tracto respiratorio o alguna ulceración en la piel, invadiendo al SNC a través de la vía sanguínea y produciendo finalmente la muerte (Cerva et al., 1973; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997). Así mismo, se ha reportado la presencia de portadores asintomáticos de *Acanthamoeba*, sin que se llegue a manifestar la EAG (Cerva et al., 1973; Rivera et al., 1984).

Por otro lado, la afluencia de bañistas es un factor importante en el aporte de AVL al agua, principalmente porque las piscinas de los tres sistemas recreacionales se encuentran

rodeadas de pasto y tierra, y el continuo tránsito de los bañistas aumenta el número de amibas, así como de bacterias y nutrientes que favorecen su sobrevivencia y desarrollo.

Otra de las infecciones causadas por *Acanthamoeba spp.*, es la QA, que a pesar de no ser tan grave, en los últimos 10 años se ha incrementado notablemente su frecuencia a nivel mundial. Hasta el 2011 se tenía registro de alrededor de 10 000 casos de QA en todo el mundo (Bonilla y Ramírez, 2011). Se ha demostrado la asociación de la QA con traumatismo corneal, el uso de lentes de contacto y el contacto con agua y aire que las contenga (Martínez y Visvesvara, 1997; Khan, 2006).

Por lo anterior, surge la importancia de desarrollar e implementar métodos para la identificación de *Acanthamoeba* precisos y confiables, tanto para la identificación del ambiente (agua en este caso), como de muestras clínicas (líquido cefalorraquídeo y exudados nasofaríngeos entre otros).

Se han reportado algunos trabajos utilizando iniciadores específicos para la identificación del género *Acanthamoeba*, y todos se han llevado a cabo con amibas obtenidas de muestras clínicas y cultivos de cepas de referencia (Vodkin et al., 1992; Howe et al., 1997; Lehmann et al., 1998) y pocos a partir de muestras ambientales (Caumo et al., 2009; Da Rocha-Azevedo et al., 2009). En este trabajo, se aplicó la purificación del ADN total, (técnica de PCR) en muestras ambientales con el propósito de comparar y evaluar su utilidad en la identificación de estas amibas.

El método tradicional de identificación, es efectivo para la identificación de *Acanthamoeba* solo a nivel de género. Para realizar el diagnóstico morfológico más preciso, se deben llevar a cabo pruebas que en promedio se realizan en 30 días y para lo cual se requiere entrenamiento y experiencia, además de conocimiento de las técnicas que se usan para tal fin.

La implementación y uso de la técnica de PCR, es especialmente importante por su aplicación en casos humanos con sospecha de estar infectados por *Acanthamoeba*. Incluso ya con la infraestructura básica, que es lo más costoso, es posible implementar la misma técnica para la detección de otras AVL patógenas, ya que de esto en ocasiones depende la recuperación del paciente y en otros inclusive la vida.

Comparando ambos métodos de identificación, se puede establecer que a pesar de que la técnica de PCR en un principio puede ser costosa, a largo plazo resulta más adecuado para la identificación de amibas del género *Acanthamoeba* del ambiente ya que una vez implementada, es sencillo realizarla.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece al Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA), Periodo 2009-2010, Proyecto 14.

REFERENCIAS

1. Bonilla, P., E. Ramírez, R. Ortíz, A. Calderón, E. Gallegos y D. Hernández, 2000. Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, México. *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*, London. 435 p.
2. Bonilla, P. y E. Ramírez, 2011. Amibas de vida libre con potencial patógeno. En: Becerril, M.A. *Parasitología Médica*. Mc Graw Hill, Pp. 31- 42. ISBN 978-607-15-0512-5.
3. Caumo, K., A. P. Frasson, C. J. Pens, L. F. Panatieri, A. P. G. Frazzon y M. B. Rott, 2009. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian City of Porto Alegre. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 6: 477-485.
4. Centeno, M., F. Rivera, L. Cerva, V. Tsutsumi, E. Gallegos, A. Calderón, R. Ortíz, P. Bonilla, E. Ramírez y G. Suárez, 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research*, 27(4): 579-586.
5. Cerva, L., 1967. Intracerebral, inoculation of experimental animals in pathogenetical studies of *Hartmannella castellanii*. *Folia Parasitology*, 14(2): 171-175.
6. Cerva, L., C. Serbus y V. Skocil, 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitology*, 20: 97-103.
7. Da Rocha-Azevedo, B., H. B. Tanowitz y F. Marciano-Cabral, 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. doi:10.1155/2009/251406
8. De Jonckheere, J. F., 1997. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Applied Environmental Microbiology*, 33 (4): 751-757.
9. Howe, D. K., M. H. Vodkin, J. N. Robert, G. S. Visvesvara y G. L. McLaughlin, 1997. Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research*, 83: 345-348.
10. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White, 1990. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. 482p.
11. John, D. T., 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. En: Kreier, J.P, Baker, J. R., (Eds.). *Parasitic Protozoa*. Academic Press. San Diego California, USA, 2(3): 143-246.
12. Khan, N. A., 2006. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS. Microbiology Review*, 30: 564-595.
13. Kilvington, S., D. F. Larkin, D. C. White y J. R. Beeching, 1990. Laboratory investigations of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal Clinical of Microbiology*, 28(12): 2722 - 2725.
14. Kowalchuk, G.A., F.J. Bruijn, I.M. Head, A.D. Akkermans y J.D. van Elsas (Eds.), 2004. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Vol. 1, Springer, New York. 922 p.
15. Kyle, D. E. y G. P. Noblet, 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *Journal of Protozoology*, 33: 422-434.

16. Lares-Villa F., 2001. Free-living amoebae infections in Mexico. IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings, 1: 13-18.
17. Lehmann, O. J., S. M. Green, N. Morlet, S. Kilvington, M. F. Keys, M. M. Matheson, J. K. G. Dart, J. I. McGill y P. J. Watt, 1998. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. IOVS., 39(7): 1261-1265.
18. Martínez, A. J., 1993. Free living amoebas: infection of the central nervous system. The Mount Sinai. Journal Medical, 60(4): 271-8.
19. Martínez, A. J. y G. S. Visvesvara, 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebae. Brain of Pathology, 7(1): 583-598.
20. Méndez, R. M., Ramírez, E., P. Bonilla y Ortiz, R., 1996. Amibas de vida libre de la familia Leptomyxidae como causa de septicemia. En Memorias del XII Congreso Nacional de Parasitología, Aguascalientes, Ags., México.
21. Page, C. F., 1998. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association. Cumbria, England, Pp. 122.
22. Pussard, M. y R. Pons, 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistological, 13 (4): 557-598.
23. Qvarnstrom, Y., A. J. da Silva, F. L. Schuster, B. B. Gelmanand y G. S. Visvesvara, 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. Journal Infection Diseases 2009, 199(8): 1139-1142.
24. Rivera, F., I. Rosas, M. Castillo, M. Chávez, R., R. E. Chio y J. Islas, 1984. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: Environmental Research, 33: 428-440.
25. Rivera, F., G. Roy-Ocotla, L. Rosas, E. Ramírez, P. Bonilla y F. Lares, 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. Environmental Research, 42:149 -154.
26. Rivera, F., F. Galván, P. Bonilla, y E. Ramírez, 1988. Pathogenic amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. En: Hazardous Waste (R. Abbou): Detection, Control, Treatment, Amsterdam, Holanda: Elsevier Science Publishers B. V. 1175-1179.
27. Sleigh, M., 1989. Protozoa and other protists. E. Arnold (Ed.). London, England. Pp. 342.
28. Visvesvara, G. S., F. L. Schuster y J. Martínez, 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N:G., Sp., Agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. Journal of Eukaryotic Microbiology, 40: 504-514.
29. Visvesvara, G. S., Moura, H., y Schuster, F. L., 2007. Pathogenic and opportunistic freelifving amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 50, 1–26.
30. Vodkin, M. H., D. K. Howe, G. S. Visvesvara y G.L. Mc Laughlin, 1992. Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. Journal of Protozoology, 39(3): 378-385.