



Revista Argentina de Microbiología

ISSN: 0325-7541

ram@aam.org.ar

Asociación Argentina de Microbiología  
Argentina

Rojas, María del C.; Rodríguez Fermepín, Marcelo; Gracia Martínez, Florencia;  
Costamagna, Sixto R.  
Presencia de Acanthamoeba spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La  
Pampa, Argentina  
Revista Argentina de Microbiología, vol. 49, núm. 3, julio-septiembre, 2017, pp. 227-234  
Asociación Argentina de Microbiología  
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213052686005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



ORIGINAL

## Presencia de *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina



María del C. Rojas<sup>a</sup>, Marcelo Rodríguez Fermepín<sup>b</sup>,  
Florencia Gracia Martínez<sup>c</sup> y Sixto R. Costamagna<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Anguil, La Pampa, Argentina

<sup>b</sup> Cátedra de Análisis Clínicos I, Área de Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Laboratorio de Biotecnología y Ecología, FCEyN, UNLPam Santa Rosa, La Pampa, Argentina

<sup>d</sup> Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 30 de agosto de 2016; aceptado el 20 de diciembre de 2016

Disponible en Internet el 9 de mayo de 2017

### PALABRAS CLAVE

*Acanthamoeba*;  
Genotipos;  
Aguada;  
PCR;  
La Pampa

**Resumen** Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* incluyen cepas patógenas y no patógenas que actualmente se encuentran clasificadas en 18 genotipos diferentes (T1-T18). Se llevó a cabo un relevamiento para determinar la presencia de cepas de *Acanthamoeba* en agua de bebida para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. Las muestras fueron sembradas en agar no nutritivo. La identificación de cepas de *Acanthamoeba* se realizó mediante polymerase chain reaction con los *primers* JDP1/JDP2 específicos para género. De las 65 muestras tomadas, 13 fueron positivas a *Acanthamoeba* spp. Estas fueron caracterizadas a nivel de genotipo mediante la secuenciación del fragmento DF3. Los resultados de la secuenciación revelaron la presencia de los genotipos T4, T5 y T15 dentro de las muestras estudiadas, siendo la más frecuente la T4. Nuestro estudio revela importancia de la presencia de *Acanthamoeba* en el ambiente ganadero y la necesidad de realizar más estudios, para asociar la presencia de estos organismos y el papel que cumplen en patologías veterinarias. Este es el primer estudio en la provincia de La Pampa que demuestra la presencia de *Acanthamoeba* y el primero estudiado a nivel de genotipo de Argentina.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [rcosta@uns.edu.ar](mailto:rcosta@uns.edu.ar) (S.R. Costamagna).

**KEYWORDS**

*Acanthamoeba*;  
Genotyping;  
Watering trough;  
PCR;  
La Pampa

**Presence of *Acanthamoeba* spp. in watering trough in La Pampa province, Argentina**

**Abstract** Free-living Amoebae of *Acanthamoeba* genus include non-pathogenic and pathogenic strains that are currently classified in 18 different genotypes, T1-T18. In this study, a survey was carried out to evaluate the presence of *Acanthamoeba* strains in watering trough sample in La Pampa province, Argentina. Samples were inoculated onto non-nutrient agar plates and were checked for the presence of *Acanthamoeba*. Polymerase chain reaction was performed with genus-specific primers JDP1/JDP2, followed by direct sequencing of the polymerase chain reaction product for molecular identification. Sequencing results revealed the presence of T4, T5 and T15 genotypes within the studied samples. Sequencing revealed presence of T4, T5 and T15 in the samples studied genotypes, the most frequent T4. Our study reveals importance of the presence of *Acanthamoeba* in the livestock environment and the need for further studies to associate the presence of these organisms and the role in veterinary pathology. To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating the presence *Acanthamoeba* in La Pampa province and the first study at the genotype level in Argentina.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introducción**

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo heterogéneo de protozoos de distribución cosmopolita. Pueden desarrollarse en condiciones de vida libre y algunas especies pueden comportarse como parásitos del hombre y otros animales<sup>30</sup>. Actualmente existen más de 100 especies de AVL y algunas de ellas pertenecen al género *Acanthamoeba*. Las especies del género *Acanthamoeba* son las más frecuentemente aisladas, tanto en ambientes naturales como artificiales<sup>17</sup>. Su ciclo biológico tiene dos etapas, una etapa activa o trofozoito que exhibe crecimiento vegetativo y una etapa latente de quiste con mínima actividad metabólica<sup>26</sup>. En los últimos diez años ha aumentado el interés en este organismo por su capacidad de producir lesiones cutáneas e infecciones de senos nasales, queratitis que afecta la visión, encefalitis granulomatosa amebiana<sup>11,17,30</sup> como también neumonía e infecciones cutáneas. Además de sus características patogénicas propias, el interés en *Acanthamoeba* radica en su capacidad de actuar como reservorio/vector de otros agentes patógenos<sup>2,11</sup>. Por otra parte, *Acanthamoeba* puede tener importancia veterinaria como lo demuestran algunos trabajos<sup>13,27,29</sup>. Actualmente son 18 los genotipos (T1-T18) conocidos de *Acanthamoeba* basados en el análisis del gen del ADNr 18S<sup>21</sup>. El objetivo de este trabajo fue el aislamiento y la caracterización molecular de los genotipos de *Acanthamoeba* en agua para consumo ganadero en La Pampa, Argentina.

**Materiales y métodos****Área de estudio**

Se colectaron muestras de agua que los rumiantes usan para bebida en establecimientos ganaderos de la provincia de La Pampa, Argentina. La provincia cuenta con una superficie de

14,34 millones de hectáreas, de las cuales 12,74 millones se dedican a producción ganadera.

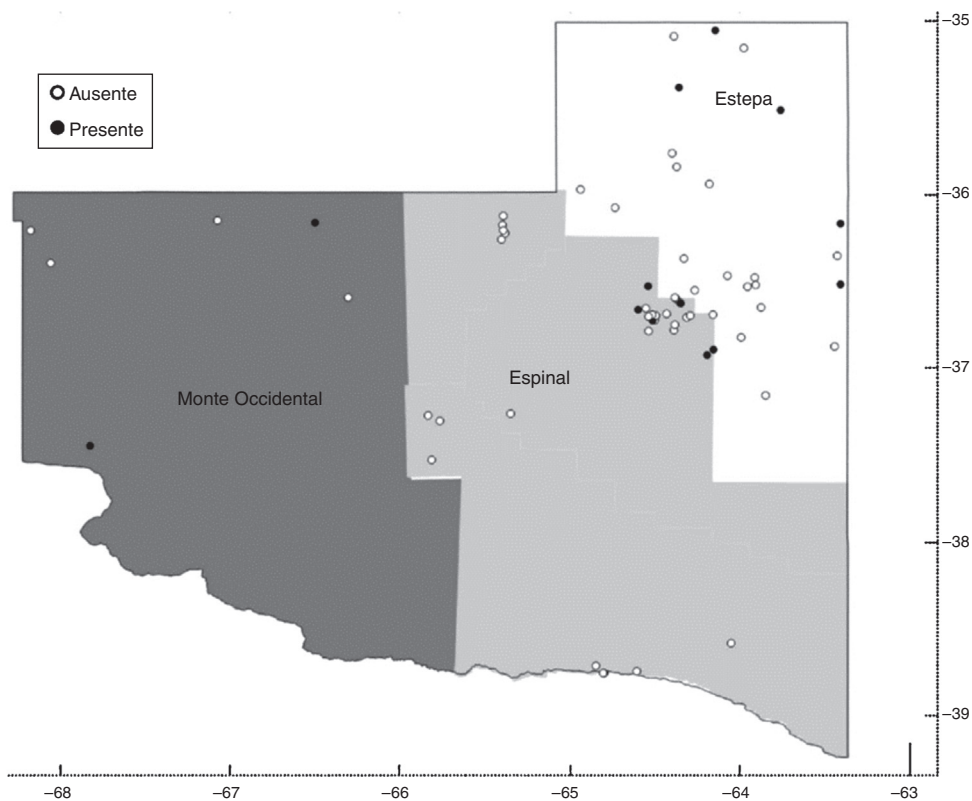
La provincia se puede dividir en tres regiones productivas<sup>16</sup>: Estepa (noroeste), Espinal (Caldenal) y Monte Occidental (Oeste). La región del noroeste es la más pequeña en cuanto a superficie y es la que presenta mejores aptitudes agroecológicas para el desarrollo de diferentes actividades agropecuarias, con un régimen hídrico de 800 mm. La región del Caldenal abarca la región central de la provincia, con una precipitación media anual de 600 mm. Representa el 40% de la superficie total, y se caracteriza por la presencia dominante de bosques de caldén. La principal actividad productiva es la ganadería extensiva (cría y recría bovina).

El Monte Occidental representa el 35% de la superficie total de la provincia. Sus características agroecológicas determinan que sea una zona principalmente ganadera (caprina y bovina); el 98% de la región es de monte y campo natural con un régimen hídrico de 400 mm anuales (fig. 1).

Cada establecimiento fue ubicado espacialmente y se registraron, para cada muestra, los datos de temperatura del agua y pH.

**Muestreo de agua y cultivo de AVL**

Las muestras de agua se obtuvieron de aguadas (fig. 2) pertenecientes a 65 establecimientos ganaderos, desde junio 2013 a enero 2015. La temperatura de las aguas estudiadas osciló entre 10 °C (en invierno) y 28 °C (en verano) y el pH entre 6 y 9. En ocho oportunidades las muestras se tomaron de aguadas naturales. De cada lugar se colectaron 500 ml de agua en frascos estériles y se dejaron decantar en el laboratorio durante 24 h. Se desechó el sobrenadante y de cada muestra se retuvo un volumen de 40 ml. El volumen retenido se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 min. Del sedimento se obtuvieron los inóculos para los cultivos. Se sembraron 100 µl del sedimento en placas de Petri con agar no nutritivo cubierto con una suspensión de *Escherichia coli*



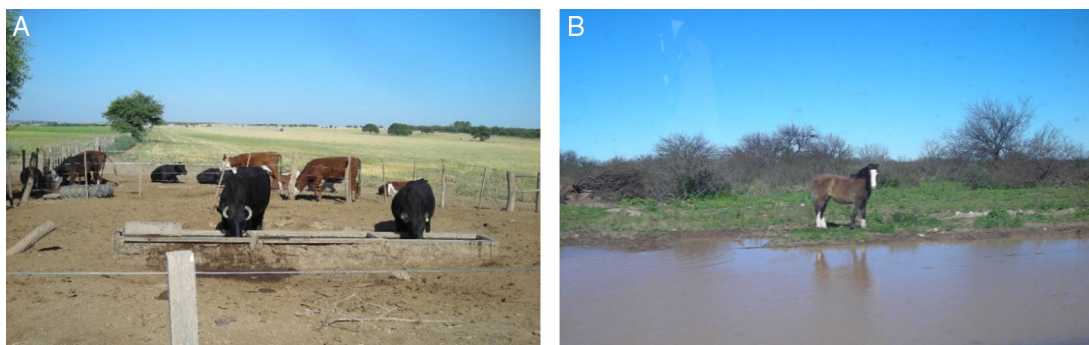
**Figura 1** Regiones agroecológicas de La Pampa: Monte Occidental, Espinal y Estepa. Localización de las agüadas muestreadas (●) y (○). Los puntos (●) indican identificación positiva a *Acanthamoeba* por PCR.

en medio de Page, como nutriente para el protozoo<sup>20</sup>. Las placas fueron incubadas a 37 °C y monitoreadas diariamente durante 15 días. Se consideraron negativas cuando pasado este tiempo no se detectó desarrollo.

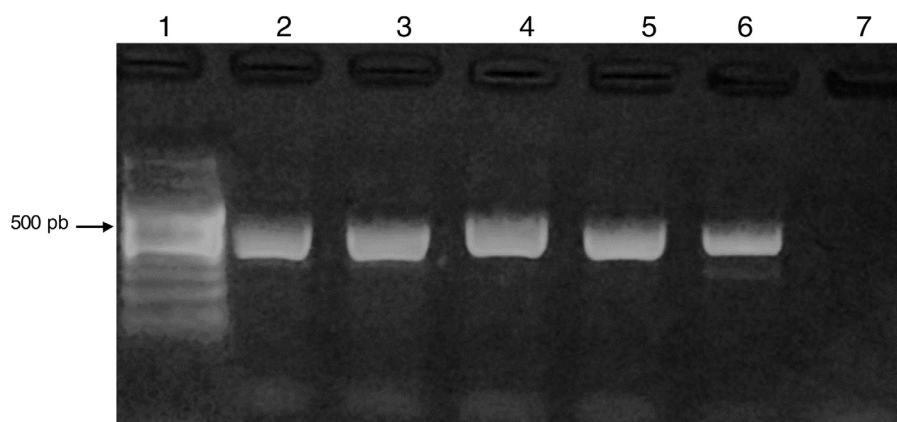
### Extracción de ADN

Los cultivos fueron concentrados raspando con asas los anillos de crecimiento de las amebas en las placas de agar utilizando 500 µl de ClK0.15M en frío, centrifugando a 1.000 rpm por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso. El ADN se extrajo utilizando el método UNSET<sup>10</sup>. El método consistió en lisar las células con 500 µl

de buffer de lisis (a temperatura ambiente) e igual volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). La suspensión se centrifugó a 8.000 rpm a 10 min. La fase acuosa se transfirió a un microtubo nuevo, se trató con 500 µl fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. Para precipitar el ADN, se añadieron 10 µl de NaCl 3 M a la solución acuosa y 1 ml etanol absoluto (frío) y se mezcló suavemente. Las suspensiones se mantuvieron a -20 °C durante toda la noche. A continuación, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 30 min. Los sedimentos se lavaron con 500 µl de etanol al 70% (frío) y nuevamente se centrifugaron a 15.000 rpm por 30 min. Los sedimentos se secaron en un bloque de calor a 55 °C, se añadieron 100 µl de agua MiliQ y se conservó a -20 °C hasta su análisis.



**Figura 2** Agüadas destinadas para consumo ganadero: A) artificiales, B) naturales.



**Figura 3** Amplificación de DF3 específico para *Acanthamoeba* spp. Calles: 1) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 2) Control positivo. 3, 4, 5 y 6) Muestras positivas de aguadas. 7) Control negativo.

### Identificación y genotipificación de *Acanthamoeba* mediante PCR

Los cebadores JDP1 y JDP2 se utilizaron para amplificar la región del ASA.S1 (Rns) que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal nuclear de la ameba<sup>25</sup>. Así se obtiene un amplímero designado como DF3 (fragmento de diagnóstico 3). La secuencia de este fragmento dentro del ASA.S1 permite la identificación de los genotipos de *Acanthamoeba*<sup>25</sup>. La mezcla de reacción, para un volumen final de 25  $\mu$ l se preparó con 1,25 U *Taq* (Promega), 0,5  $\mu$ l mix de dNTPs (10 mM de cada dNTP, Promega), 2,5  $\mu$ l buffer (Promega), cebador JDP1 1,5  $\mu$ l (1  $\mu$ M), JDP2 1,5  $\mu$ l (1  $\mu$ M) y 5,0  $\mu$ l de templado de ADN. Para el desarrollo de la PCR se utilizó un termociclador IVEMA T18 y las condiciones de reacción fueron: 95 °C por 7 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 min, y una extensión a 72 °C por 10 min.

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa (Biodynamics) al 1,5%, se tiñeron con 5  $\mu$ l de GEL RED (BIOTIUM) y se visualizaron bajo luz UV con un transiluminador DyNA Light Dual LABNET. Se observó un producto entre 423-521 pb. Como control positivo se utilizó una cepa de *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461.

### Secuenciación de los aislados de *Acanthamoeba*

Los productos obtenidos de la PCR fueron purificados y concentrados utilizando el kit DONGSHENG BIOTECH (Montebio). Posteriormente fueron secuenciados en la Unidad Genómica –Instituto de Biotecnología– CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires). La identificación genotípica se basó en la técnica publicada por Booton<sup>3</sup>. Con el fin de clasificar los aislamientos, se realizó la búsqueda de secuencias homólogas depositadas en Genbank mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para buscar la mayoría de las secuencias de referencias similares. Los alineamientos y los árboles filogenéticos se construyeron con el programa *Molecular Evolution Genetic Analysis software*

(MEGA7) (<http://megasoftware.net>), utilizando el método de vecino más cercano (Neighbor-joining) y el modelo de *Maximum Composite Likelihood*, con un bootstrap de 1.000 muestreos al azar.

### Resultados

El 83% de los casos estudiados (54/65) presentó crecimiento de AVL en placas de agar no nutritivo. En el 24% de las muestras con presencia de AVL (13/54), por la morfología, se las identificó como pertenecientes al género *Acanthamoeba*, confirmándose por PCR utilizando cebadores específicos de género (fig. 3).

Como parte de un estudio más exhaustivo, se identificaron los genotipos de *Acanthamoeba* spp. mediante secuenciación del gen del ADNr 18S (tabla 1). La secuenciación se efectuó sobre siete cepas y los aislamientos fueron alineados con secuencias de referencia del *GenBank* y con las identificadas por Booton et al.<sup>3</sup>. El análisis filogenético de las secuencias identificó cinco aislamientos (KX714006, KX714007, KX714008, KX714010 y KX714012) dentro del genotipo T4, uno (KX714009) dentro del T5 y el restante (KX714011) como T15. Todos presentaron identidades nucleotídicas superiores al 85% (fig. 4).

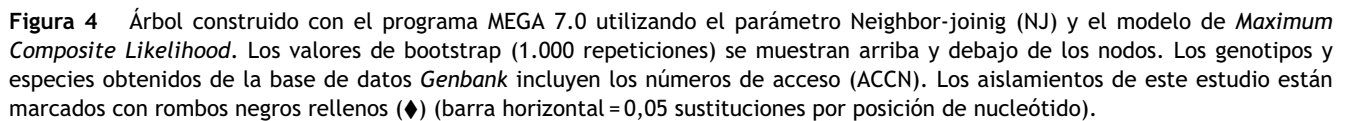
### Discusión

Existen estudios ambientales en todo el mundo donde se informa la presencia de cepas de *Acanthamoeba* spp.<sup>1,4,6–8,14,19,22,28</sup>.

Hasta el momento, se han descrito 18 genotipos diferentes (T1- T18) de *Acanthamoeba* spp.<sup>21</sup>. El genotipo T4 es el más común tanto en el ambiente como en aislados de individuos con patología<sup>15,26</sup> y es el que presenta la mayor variabilidad genética. Asimismo, se han descrito otros genotipos como causantes de infecciones en humanos y en animales<sup>13,15,21</sup>.

En Argentina existen reportes de *Acanthamoeba* spp. aisladas de agua de piscina, en casos de queratitis humanas<sup>5,9,17,18,30</sup>. Sin embargo, no se han realizado genotipificaciones. A pesar de la naturaleza ubicua de esta especie, no existen estudios a nivel del ambiente ganadero





asociados a patologías humanas como queratitis (T4, T5 y T15) y encefalitis (T4). En tres de los establecimientos ganaderos en los que se identificó la presencia de *Acanthamoeba* spp., se tiene registro de problemas de queratoconjuntivitis infecciosa bovina recurrente, pero en ningún momento se ha estudiado la presencia de *Acanthamoeba* spp. asociada a esta patología. Otro problema registrado en los establecimientos muestreados es la mortandad de terneros en verano por problemas nerviosos. La casuística de enfermedades con signos nerviosos en nuestro país aumentó con la necesidad del país de ser declarado libre de encefalopatía espongiiforme bovina. El estudio de la encefalitis amebiana debería ser incluido dentro del diagnóstico diferencial de las

**Tabla 1** Genotipos de *Acanthamoeba* identificados en la provincia de La Pampa, Argentina

	Código muestreo	Latitud	Longitud	Cultivo en ANN	PCR	Especies	Genotipo	Nº de Acceso Genbank
1	HLP	−36.178	−66.520	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T4	KX714007
2	OF	−35.516	−63.785	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T4	KX714012
3	LV	−36.310	−62.203	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T4	KX714010
4	IRU	−36.394	−62.184	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T4	KX714008
5	LP DG	−36.921	−64.180	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T5	KX714009
6	DT	−36.190	−65.423	—	—			
7	ESC-Agro	−36.133	−65.414	+	—			
8	Verg_LF	−36.255	−68.466	+	—			
9	JL	−36.273	−65.425	+	—			
10	DJ	−36.235	−65.406	+	—			
11	CM	−36.222	−65.414	+	—			
12	Plu	−36.160	−67.093	+	—			
13	Pcer	−37.487	−67.846	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ND	
14	PmaMo	−36.412	−68.077	+	—			
15	HR-3	−35.846	−64.395	+	—			
16	HR-1	−35.950	−64.204	—	—			
17	Gir	−36.644	−64.381	+	—			
18	Cu	−36.620	−64.404	+	—			
19	Ita	−36.732	−64.336	+	—			
20	Lac	−36.718	−64.183	+	—			
21	Cmart	−34.756	−64.169	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ND	
22	MZ	−36.653	−64.370	+	+	<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	T15	KX714011
23	Gz Mz	−36.574	−64.292	+	—			
24	Rolr	−36.618	−64.405	+	—			
25	Agro-ST	−36.386	−64.352	—	—			
26	Ed-Mz	−36.714	−64.453	+	—			
27	Can-tti	−36.747	−64.526	+	—			
28	CV	−36.754	−64.540	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T4	KX714006
29	Mchio	−36.720	−64.517	+	—			
30	PPri	−36.715	−64.540	+	—			
31	El-Sos	−36.726	−64.564	—	—			
32	Aba-rca	−36.813	−64.564	—	—			
33	LBV-B	−36.682	−64.579	+	—			
34	DJ-Pund	−36.547	−64.564	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ND	
35	LM-Zap	−36.689	−64.621	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ND	
36	IN-Angu	−36.541	−63.932	—	—			
37	M-ONAVE	−35.080	−64.410	+	—			
38*	L-INTA	−36.553	−63.978	+	—			
39	AE-CP	−37.570	−65.837	+	—			
40	Chacha-IN	−37.341	−65.788	+	—			
41	LA-Mont	−36.952	−64.219	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ND	
42	Bald-Bich	−35.766	−64.423	+	—			
43	Igles	−35.383	−64.383	+	+	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ND	
44	VA	−37.190	−63.872	—	—			
45	PZ	−36.501	−63.936	+	—			
46	BLAn	−36.853	−64.019	+	—			
47	Lpalo	−36.777	−63.370	+	—			
48	CIN	−36.677	−63.900	+	—			
49	HR-99	−36.088	−64.761	—	—			
50	LR-La PAST	−36.616	−66.326	—	—			
51*	PI-M1	−38.783	−64.872	—	—			
52*	PI-M2	−38.822	−64.823	+	—			
53*	PI-M3	−38.823	−64.826	+	—			
54*	PI-M4	−38.811	−64.633	+	—			
55*	PI-M5	−38.649	−64.074	—	—			

Tabla 1 (continuación)

	Código muestreo	Latitud	Longitud	Cultivo en ANN	PCR	Especies	Genotipo	N° de Acceso Genbank
56*	LJUA	−37.299	−65.372	+	—			
57*	Cuen_MR	−36.807	−64.414	+	—			
58	Pamp-MIA	−36.724	−64.314	+	—			
59	PN-	−36.778	−64.406	+	—			
60	TLAG	−34.482	−64.000	+	—			
61	D-TERE	−35.150	−64.000	+	—			
62	LA-ISAB	−35.982	−64.964	+	—			
63	EL-MIST	−36.405	−63.355	+	—			
64	GALL	−36.487	−64.098	+	—			
65	LA-LAUR	−37.308	−65.860	+	—			

\* Los asteriscos indican aguadas naturales.

patologías del sistema nervioso central en el ganado, en especial en verano.

En todos los casos mencionados no se asoció a la presencia de *Acanthamoeba* spp., debido a la falta de conocimiento de este organismo como causante de estas patologías. Asimismo, cabe mencionar que son portadores de otros organismos (por ejemplo, *Chlamydia*) que también podrían favorecer a la presencia de estas y otras patologías. Este estudio permite confirmar la presencia de *Acanthamoeba* spp. genotipos T4, T5 y T15 en aguas utilizadas para consumo ganadero, todas ellas de importancia zoonótica. Esto abre la posibilidad de estudios futuros ya que estos organismos actúan como vehículos o vectores de transmisión (como «caballos de Troya») para otros patógenos<sup>12,23,24</sup>, potencial adicional para la ganadería y de precaución para el personal rural.

La información proporcionada en este estudio sirve como línea de base para futuros estudios sobre el papel del género *Acanthamoeba* como reservorio y vector de enfermedades bacterianas o virales fundamentalmente, en el ambiente ganadero de la provincia.

## Conclusión

*Acanthamoeba* ha ganado una creciente atención por parte de la comunidad científica debido a su capacidad para capturar microorganismos por fagocitosis, actuar como vectores y/o reservorios para los patógenos microbianos, y para producir infecciones graves en humanos y en los animales. Este trabajo permitió confirmar la presencia de *Acanthamoeba* en aguadas de sistemas ganaderos en la provincia de La Pampa y que las cepas secuenciadas pertenecen a los genotipos T4, T5 y T15. Se requieren más estudios para evaluar cómo actúa *Acanthamoeba* como fuente potencial de infección para el ganado y el personal rural. Este es el primer estudio epidemiológico referido a presencia de AVL en aguadas de la Provincia de La Pampa, Argentina.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Agradecemos al Área de Sanidad Animal de INTA Anguil, a la Lic. María Sol Poey (INTA, Agencia de Extensión Rural Victorica), a los profesionales y a los productores que colaboraron en ofrecer sus establecimientos. Se agradece, además, al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por financiar parcialmente este trabajo (Resol. N.º 1029/12 y 743/12).

## Bibliografía

- Alves D, de S, Moraes AS, Nitz N, de Oliveira MG, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R, Cuba CA. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5 and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. *Exp Parasitol*. 2012;131:239–44.
- Barker J, Brown MR. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*. 1994;140:1253–9.
- Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DSC, Byers TJ, Fuerst PA. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1621–5.
- Coşkun KA, Özçelik S, Tutar L, Elaldı N, Tutar Y. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Bio Med Research International*. 2013:675145.
- D'Alessandro LP, Rossetti SB. Queratitis por *Acanthamoeba* en un paciente usuario de solución multipropósito de limpieza de



- lentes de contacto: Primer Caso en Argentina. *Oftalmol Clin Exp*. 2007;1:29–31.
6. De Jonckheere JF. Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). *Eur J Protistol*. 2007;43:9–15.
  7. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuha Y, Karanis P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* sp. from tap water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res*. 2009;105:1109–17.
  8. García A, Goñi P, Clavel A, Lobe S, Fernandez MT, Ormad MP. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ Microbiol Rep*. 2011;3:622–5.
  9. Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Lujan H, Occhionero M, Panizza L, Visciarelli E, Costamagna SR. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular, en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42:122–5.
  10. Hugo ER, Stewart VJ, Gast RJ, Byers TJ. Purification of amoeba mtDNA using the UNSET procedure. En: Lee JJ, Soldo AT, editores. *Protocols in protozoology*. Lawrence, Kansas: Allen Press; 1992. p. 7–11.
  11. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30:564–95.
  12. Khan NA, Siddiqui R. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. *Parasitol Open*. 2014;5:1–6.
  13. Kinde H, Read DH, Daft BM, Manzer M, Nordhausen RW, Kelly DJ, Fuerst PA, Booton G, Visvesvara GS. Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthiamandriilaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19:317–22.
  14. Lorenzo J, Lindo JF, Martinez E, Calder D, Figueruelo E, Valladares B, Ortega A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99:751–8.
  15. Lorenzo J, Martín CM, López A, Arnalich F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba keratitis*: an emerging disease gathering importance worldwide. *Trends Parasitol*. 2013;29:181–7.
  16. Lorda H, Roberto Z, Bellini Saibene Y, Sipowicz A, Belmonte ML. 2008. Descripción de zonas y subzonas agroecológicas RIAP. Área de influencia de la EEA Anguil [consultado 17 Jun 2016]. Disponible en: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp dt\\_96\\_zonas.riap.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp dt_96_zonas.riap.pdf)
  17. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:273–307.
  18. Menghi C, Caride MC, Gatta C. *Acanthamoeba* sp.: un caso de queratitis no relacionada con el uso de lentes de contacto. *Rev Argent Microbiol*. 2012;44:275–7.
  19. Niyayati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebbi M, Maghsood AH, Motevalli-Haghi A, Martín-Navarro CM, Farnia S, Valladares B, Rezaeian M. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol*. 2009;121:242–5.
  20. Page F. An illustrated key too freshwater and soil amoeba. Ambleside, England: Titus Wilson & Son, Ltd., editors; 1976.
  21. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersin* sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol*. 2013;60:626–33.
  22. Shoff ME, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal DV. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J Water Health*. 2008;6:99–104.
  23. Scheid PL, Schwarzenberger R. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitol Res*. 2011;109:499–504.
  24. Scheid P, Schwarzenberger R. *Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses. *Parasitol Res*. 2012;111:479–85.
  25. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1903–11.
  26. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012;5:1–13.
  27. Taylor PW. Isolation and experimental infection of free-living amoebae in freshwater fishes. *J Parasitol*. 1997;63:232–7.
  28. Tanveer T, Hameed A, Muazzam AG, Jung SY, Gul A, Matin A. Isolation and molecular characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotypes from diverse water resources including household drinking water from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Parasitol Res*. 2013;112:2925–32.
  29. Van der Lugt JJ, van der Merwe HE. Amoebic meningoencephalitis in a sheep. *J S Afr Vet Assoc*. 1990;61:33–6.
  30. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthiamandriilaris*, *Naegleriafowleri*, and *Sappiniadiptloidea*. *FEMS Immunol Med Microbial*. 2007;50:1–26.