



# Identificación de aislados de *Acanthamoeba* spp mantenidos en el laboratorio de amibirosis-UCV, mediante PCR- RFLP

Mónica Galindo <sup>1</sup>.

María Alejandra Vethencourt <sup>2</sup>.

Anaibeth Nessi <sup>3</sup>.

Carlos Conde <sup>4</sup>.

Victoria Luongo <sup>5</sup>.

Raibeth Machado <sup>6</sup>.

Alejandra Ugarte <sup>7</sup>.

María Virginia Pérez de Galindo <sup>8</sup>.

Carolina Wagner <sup>9</sup>.

Carmen Guzmán de Rondón <sup>10</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis.  
Universidad Central de Venezuela. galindomonica@yahoo.com

<sup>2</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis.  
Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis.  
Universidad Central de Venezuela.

<sup>4</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis.  
Universidad Central de Venezuela.

<sup>5</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis.  
Universidad Central de Venezuela.

<sup>6</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

<sup>7</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

<sup>8</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

<sup>9</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

<sup>10</sup>Laboratorio de Amibirosis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 20 de Octubre del 2015 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

Dentro del género Acanthamoeba existen especies relacionadas con patologías presentes en los humanos. Su identificación y clasificación se realizaba por morfología, pero es subjetiva y de baja sensibilidad y especificidad. Por ésto, es importante incorporar herramientas de biología molecular. El objetivo de esta investigación fue caracterizar molecular y morfológicamente 24 aislados de Acanthamoeba, mantenidos en el Laboratorio de Amibirosis-Escuela de Bioanálisis-UCV, mediante PCR-RFLP (HinfI, Hhal y HaeIII), previamente identificados morfológicamente como Acanthamoeba (Pussard y Pons 1977). Ningún aislado perteneció al grupo I. De los 24 aislados, 45,8% presentó características morfológicas compatibles con el grupo II, 45,8% con el grupo III y 8,4% con ambos grupos. Molecularmente, 50% de los aislados amplificaron productos de 900 pb y 50% de 700 pb. Los aislados del grupo III, no se pudieron caracterizar molecularmente por PCR-RFLP, ya que el patrón de digestión no coincidió con patrones previamente publicados. Solo se identificó el 33% de los aislados resultando: *A. polyphaga* (A9, A12, A13, A14), *A. castellanii* (A26, A27, A28 y A29) y *A. castellanii* o *A. polyphaga* (A15, A25 y A30). Las especies identificadas coinciden con las patógenas más comúnmente descritas en la literatura.

**PALABRAS CLAVE:** Amibas de vida libre, Acanthamoeba spp, PCR-RFLP.

IDENTIFICATION OF ACANTHAMOEBA SPP. ISOLATES MAINTAINED AT THE AMIBIASIS LABORATORY OF UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, USING PCR-RFLP

## SUMMARY

Acanthamoeba genus includes some species related to pathology in humans. Their identification and classification was made by morphology, but it is a subjective technique and has low sensitivity and specificity. For these reasons, it is important to incorporate molecular tools. The objective of this research was to characterize morphologic and molecular features of 24 Acanthamoeba isolates, maintained at Laboratorio de Amibirosis-Escuela of Bioanálisis-UCV, previously identified as Acanthamoeba, using light microscopy and morphological criteria according to Pussard and Pons, 1977 and PCR-RFLP (HinfI, Hhal and HaeIII) respectively.

Morphologically, none of the strains belonged to group I. 45.8% of all isolates presented compatible morphology with Group II, other 45.8% with group III and 8.4% with both groups. Molecularly, 50% of the isolates amplified a 900 pb product and the other 50%, a 700 pb product. Isolates of Group III could not be molecularly characterized by PCR-RFLP, since the digestion pattern have no coincidence with previous reports. Only 33% of strains were finally identified: *A. polyphaga* (A9, A12, A13, A14), *A. castellanii* (A26, A27, A28 and A29) and *A. castellanii* or *A. polyphaga* (A15, A25 and A30). The identified species are consistent with the most common pathogens described at the literature. Key words: Free living amoebae; *Acanthamoeba* spp; PCR-RFLP.

**KEY WORDS:** Free living amoebae, *Acanthamoeba* spp, PCR-RFLP

## **IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE ACANTHAMOEBA SPP MANTENIDOS EN EL LABORATORIO DE AMIBIASIS-UCV, MEDIANTE PCR-RFLP**

### **INTRODUCCIÓN**

Las Amibas de Vida Libre (AVL) son protozoarios que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza<sup>(1)</sup>. Algunas especies se han encontrado causando enfermedades del sistema nervioso central, así como úlceras corneales<sup>(2)</sup> y conjuntivitis<sup>(3)</sup>. Hasta ahora se han reportado como agentes causales de enfermedad en humanos: *Naegleria fowleri*, varias especies del género *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*<sup>(2,4)</sup>, *Sappinia pedata*<sup>(5)</sup>, de la cual sólo se ha reportado un caso, un caso de Meningoencefalitis producida por *Paravahlkampfia francinae*<sup>(6)</sup> y un caso de keratitis atípica en un paciente con herpes, del cual se aisló *Paravahlkampfia* sp.<sup>(6)</sup>

Las AVL del género *Acanthamoeba*, son las que producen mayor número de casos de afecciones en el hombre y se han descrito varias especies que pueden producir principalmente tres patologías: Encefalitis Granulomatosa Amibiana (EGA), queratitis Acanthamebiana (QA) y Dermatitis Acanthamebiana (DA). De éstas, la QA es la manifestación clínica más frecuente, principalmente en personas inmunocompetentes usuarios de lentes de contacto<sup>(7)</sup>, reportándose que 1 de cada 1500 usuarios de lentes de contacto, en el transcurso de 30 años de uso, pueden desarrollar úlcera corneal. Actualmente, se reconoce el incremento de las úlceras corneales producidas por amibas del género *Acanthamoeba*, en diferentes partes del mundo<sup>(8)</sup>.

El diagnóstico de las AVL como agente causal de patologías en el humano no es fácil. Sin embargo, la identificación morfológica a partir de cultivos, a pesar de su gran utilidad, carece de rapidez y su sensibilidad es limitada para realizar el diagnóstico oportuno<sup>(9)</sup>.

Dentro del género *Acanthamoeba* se han descrito varias especies y subespecies. Las especies que se han aislado a partir de muestras biológicas con mayor frecuencia son: *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. rhysodes*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis*. Inicialmente, éstas se clasificaban basándose en los criterios establecidos por Pussard y Pons 1977<sup>(10)</sup>, quienes propusieron la existencia de tres grupos, basándose en el tamaño y la

morfología de los quistes. En el grupo I se incluían las especies que presentaban quistes grandes ( $> 18\mu\text{m}$ ), ectoquiste liso y redondeado y claramente separado del endoquiste, con un aspecto estrellado. En el grupo II y III se ubicaban las especies cuyos quistes eran menores de  $18\mu\text{m}$ . El ectoquiste de las especies del grupo II presenta un aspecto arrugado y el endoquiste estrellado, poligonal o triangular; mientras que a los quistes del grupo III se les describe un ectoquiste liso y un endoquiste redondeado o ligeramente angular, con poca separación entre ambos. Esta clasificación entre especies es difícil y poco específica, sobre todo entre el grupo II y III, cuyos quistes a veces no son fácilmente diferenciables<sup>(10)</sup>.

En la actualidad, el empleo de técnicas moleculares, ha permitido que la clasificación y el diagnóstico de estas amibas sean mucho más rápidos, sensibles y específicos.

Diversas técnicas moleculares se han empleado para la clasificación de aislados de *Acanthamoeba*. El RFLP o Polimorfismo de la longitud de los fragmentos obtenidos por enzimas de restricción, en conjunto con la PCR, se utilizan para detectar e identificar estos parásitos<sup>(11,12)</sup>. Con el objeto de realizar la genotipificación de aislados de *Acanthamoeba*, se ha empleado la caracterización del gen RNAr 18S cuyo polimorfismo ha permitido identificar 17 genotipos (T1-T20). Se ha observado que las especies relacionadas con la producción de úlceras corneales se encuentran en los grupos T2-T6 y T11-T15, siendo el genotipo mas fuerte el T4, el cual se relaciona con el grupo II de acuerdo a la clasificación morfológica.<sup>(12-16)</sup>

En Venezuela, hasta ahora, no había sido posible establecer las especies de *Acanthamoeba* más frecuentes, lo cual ha limitado la evaluación clínica del paciente en relación a la susceptibilidad, pronóstico y tratamiento.

Por las razones anteriormente expuestas, se evaluó el gen de la subunidad ribosomal 18S de 24 aislados de *Acanthamoeba* spp, obtenidos de muestras de personas, tanto sintomáticas como asintomáticas y de lentes de contacto, mantenidos en el Laboratorio de Amibirosis de la Escuela de Bioanálisis de la UCV.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 24 aislados provenientes de diversas muestras biológicas (úlceras corneales, hisopado conjuntival, exudado conjuntival, lentes de contacto, heces y aspirado de absceso cerebral). Previamente se habían identificado según su morfología como *Acanthamoeba* spp, y se mantuvieron en cultivo en medio de Chinchilla modificado<sup>(9)</sup>, desde su aislamiento hasta la fecha. La nomenclatura empleada para su identificación fue acordada por los miembros de este laboratorio, empleando la letra "A" precediendo a un número asignado. Los aislados fueron: A1, A2, A3, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A25, A26, A27, A28, A29, A30, A31.

### Clasificación Morfológica

Se realizó la clasificación en grupos, siguiendo los criterios propuestos por Pussard y Pons<sup>(10)</sup>.

## **Caracterización Molecular (PCR-RFLP)**

El ADN fue extraído de trofozoítos y quistes obtenidos de medio de cultivo monoxénico de Chinchilla modificado, incubado a 37°C por 72 horas. Los trofozoítos y quistes colectados, se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4, y fueron ajustados a una concentración determinada, mediante recuento en Cámara de Neubauer. Posteriormente, fueron resuspendidos en 300 µL de tampón de lisis, se almacenó durante 24 horas a 0°C y el ADN se extrajo con minicolumna, según instrucción del fabricante (Wizard®, Promega, USA).

La pureza y concentración del ADN se determinó midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm; además se determinó la relación 230/260 nm y 260/280 nm.

Se realizó la amplificación por PCR de una región del gen que codifica la Subunidad Ribosomal menor 18S (ARNr SU 18S), empleando los iniciadores descritos previamente por Kong y Chung<sup>(17)</sup>, Acantha-for (5' TTTGAATTCCGCTCCAATAGCGTATATTAA3') y Acantha-rev (5' TTTGAATTCAGAAAGAGCTATCAATCTCT 3'), los cuales dan origen a amplificados entre 910-930 pb.

La mezcla de PCR se realizó a un volumen final de 50 µL, con las siguientes concentraciones finales: 1X del tampón de PCR; 0,2 mM de los dinucleótidos (dNTPs); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de cada primer y 1 unidad de *Taq* Platinium (Promega®, USA). La amplificación de la PCR se realizó a 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 60 segundos y 72 °C por 1,5 minutos. Una desnaturación inicial a 94 °C por 3 minutos y una fase de polimerización final de 10 minutos a 72 °C. Los amplificados se corrieron en gel de agarosa al 2% en tampón TBE, junto con un marcador de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen®, USA) y revelado con SYBR safe (Invitrogen®, USA). Las concentraciones de los reactivos para realizar la PCR y las condiciones de amplificación, fueron estandarizadas previamente en el Laboratorio de Amibiasis-UCV (datos no publicados).

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción (RFLP) *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III (Promega®, USA), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Los geles fueron fotografiados con un trasluminador de LUV y comparados los perfiles electroforéticos de bandas, con los descritos por Kong y Chung, 1996<sup>(17)</sup>.

Para obtener el tamaño de los fragmentos de restricción, se midió la distancia recorrida por cada una de los fragmentos del marcador de Pb y se relacionó con el tamaño en pb en un sistema de coordenadas semilogarítmico. De esta forma, se obtuvo una recta la cual se utilizó para extrapolar los fragmentos obtenidos de los aislados, luego del RFLP.

## **Análisis estadístico**

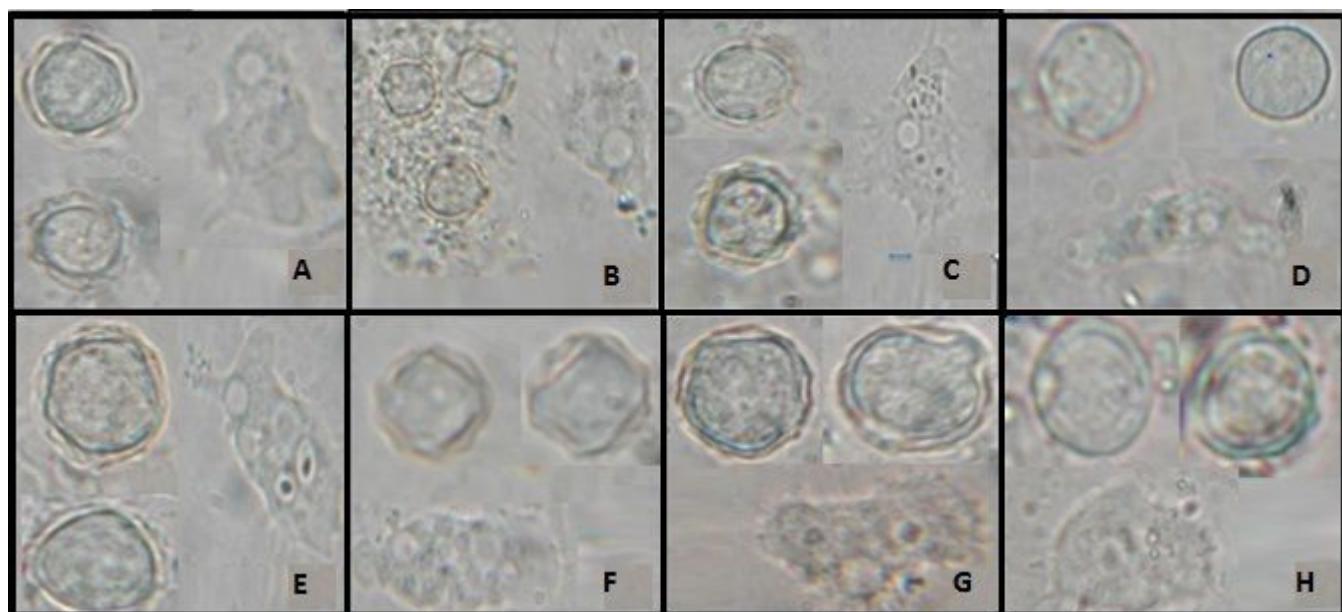
El análisis estadístico que se utilizó en esta investigación fue de tipo no paramétrico debido al tamaño de la muestra. Dependiendo de las comparaciones a realizar se empleó la prueba de Mann-Whitney U o Prueba exacta de Fischer, utilizando el software SPSS versión 18. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica de los quistes

Los aislados A2, A12, A13, A14, A15, A25, A27, A28, A29, A30 y A31 fueron incluidos en el grupo II, por presentar quistes con el ectoquiste plegado. Los aislados A1, A3, A10, A11, A16, A17, A18, A19, A20, A21 Y A22 se incluyeron dentro del grupo III, ya que presentaban quistes con el ectoquiste liso. Los quistes de los aislados A9 y A26 presentaron morfologías compatibles tanto con grupo II y grupo III, observándose el 60% de los quistes con superficie plegada. El diámetro de los quistes pertenecientes al grupo II fue en promedio 11,85  $\mu\text{m}$  (Rango: 9,6-14,0  $\mu\text{m}$ ), significativamente más grande ( $p= 0,035$ , una cola) que los del grupo III, los cuales medían en promedio 9,5  $\mu\text{m}$  (Rango: 7,8-10,85  $\mu\text{m}$ ).

También se tomó en cuenta el número de puntas del endoquiste y la cantidad de éstas que hacen contacto con el ectoquiste. Los aislados del grupo III presentaban muy pocas o ninguna punta en el endoquiste, por lo tanto no existe contacto con la pared, a diferencia de los aislados clasificados en el grupo II, en los que se observa el endoquiste poligonal o estrellado, con 1 a 5 puntas que contactan con el ectoquiste. La diferencia del valor promedio de las puntas que contactan es estadísticamente significativo entre ambos grupos ( $p= 0,005$ ). (Fig.- 1)



**Figura 1.**- Trofozoítos y quistes de algunos aislados de *Acanthamoeba* spp pertenecientes al grupo II y III según Pussard y Pons. Examen directo de cultivo en medio Chinchilla modificado. Objetivo 100x. A: quistes y trofozoítos de A2 B: quistes y trofozoítos de A13 C: quistes y trofozoítos de A14 D: quistes y trofozoítos de A16 E: quistes y trofozoítos de A15 F: quistes y trofozoítos de A29 G: quistes y trofozoítos de A30 H: quistes y trofozoítos de A21

### Caracterización morfológica de los trofozoítos

Para la caracterización morfológica de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. se tomó en cuenta el diámetro mayor y menor de los trofozoítos, número de vacuolas contráctiles, diámetro de las vacuolas contráctiles, pseudópodos emitidos y número de acantopodios. En

términos generales, los trofozoítos clasificados dentro del grupo II fueron estadísticamente más grandes, tanto en longitud mayor (LM) ( $21,7 \pm 6,3 \mu\text{m}$ ), como en longitud menor (Lm) ( $11,6 \pm 3,75 \mu\text{m}$ ) que aquellos que se ubicaron en el grupo III (LM  $18,67 \pm 8,28 \mu\text{m}$ ; Lm  $10,28 \pm 4,27 \mu\text{m}$ ). Se observó diferencias significativas en el número de pseudópodos emitidos siendo mayor para los trofozoítos del grupo III ( $p=0,04$ ). El tiempo de mantenimiento en el Laboratorio de los aislados del grupo III, fue significativamente mayor que el de los aislados ubicados en el grupo II ( $p= 0,020$ ). (Fig.-1)

### Clasificación molecular

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Producto de la amplificación del ADN, se obtienen fragmentos de 900 pb para los aislados A9, A12, A13, A14, A15, A25, A26, A27, A28, A29, A30 y A31 y de 700 pb para los aislados A1, A3, A10, A11, A16, A17, A18, A19, A20, A21 y A22, lo cual se corresponde con la existencia de los grupos morfológicos II y III, respectivamente. Únicamente el aislado A2 clasificado dentro del grupo II presentó un producto de 700 pb (Fig.- 2)



**Figura 2.**-Productos de PCR de surRNA18 de aislados de *Acanthamoeba* spp. pertenecientes al grupo II y grupo III según los criterios morfológicos. PB: Marcador de 100 pares de bases; M: Mezcla; pb: pares de bases producto de RFLP

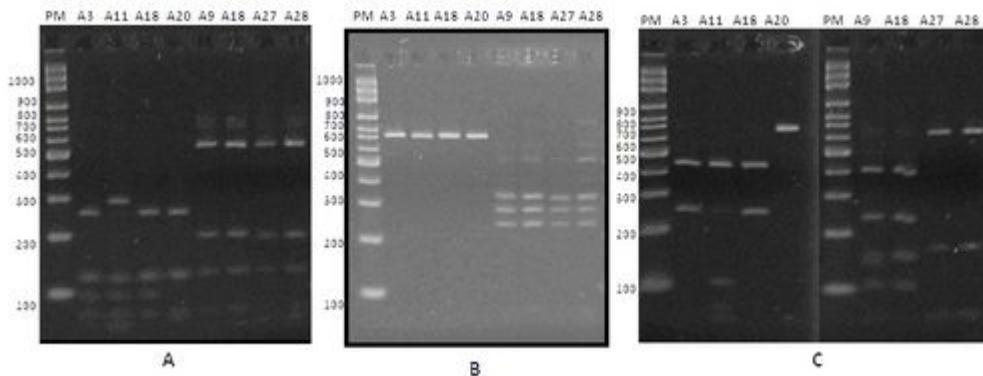
Al evaluar la relación entre el tiempo de mantenimiento en cultivo y el tamaño del producto del PCR obtenido de los aislados de *Acanthamoeba* spp., se observó que los aislados con más de 10 años de mantenimiento en cultivo presentaban productos de 700 pb, mientras que aquellos que tenían un tiempo de mantenimiento menor a 10 años, presentaban un producto de 900 pb ( $p=0,007$ ).

### RFLP

Una vez realizada la digestión de los productos de PCR con las enzimas *Hinf* I, *Hha* I y *Hae* III, solo se pudo identificar el 33% de los aislados estudiados. Los aislados pertenecientes al grupo

III con productos de PCR de 700 pb, no pudieron ser identificados, por no poder compararse con los patrones de digestión publicados por Kong y Chung (17).

La caracterización molecular aplicada (PCR-RFLP) permitió determinar las especies de los aislados A9, A12, A13, A14 como *A. polyphaga* y la especie de los aislados A26, A27, A28 y A29 como *A. castellanii*. (Fig.- 3)



**Figura 3.** Perfil de digestión del gen de la subunidad ribosomal 18S de los aislados A3, A11, A18, A20,A9,A18, A27, A28 de *Acanthamoeba* spp. En el Gel A se observa la digestión realizada con *Hinf* I En el Gel B se observa la digestión realizada con *Hha* I En el Gel C se observa la digestión realizada con *Hae* II Electroforesis en gel de Agarosa al 2,5%, teñido con SYBER safe (Invitrogen®, USA). PB: Marcador de 100 pares de bases; M: Mezcla; pb: pares de bases producto del RFLP. C1:control 1- *A. castellani* C2: control 2-*A polyphaga*.

Los aislados A15, A25 y A30, se identificaron como *A. castellanii* o *A. polyphaga*, quedando pendiente su determinación a través de otras metodologías moleculares.

En lo que respecta a A31, no se obtuvo digestión con las enzimas seleccionadas, ya que el producto amplificado por PCR no tuvo un rendimiento adecuado aunque se intentó concentrar el ADN o realizar una reamplificación de productos anteriores, visualizándose una débil banda de 900 pb luego de la electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

En la Tabla 1 se puede observar los aislados, producto de PCR e identificación a nivel de especie y relación con el tiempo que han permanecido en cultivo.

3	Procedencia	Año
A1	Úlcera corneal	1988
A2	Exudado nasal	1991
A3	Úlcera corneal	1991
A9	Hisopado conjuntival	1992
A10	Heces-diarrea	1993
A11	Úlcera corneal	1993
A12	Úlcera corneal	1994
A13	Heces	1994
A14	Heces	1994
A15	Lentes de contacto y úlcera corneal	1995
A16	Lentes de contacto y úlcera corneal	1996
A17	Lentes de contacto y úlcera corneal	1995
A18	Exudado conjuntival	1996
A19	Úlcera corneal	1996
A20	Exudado conjuntival	1997
A21	Exudado conjuntival	1995
A22	Úlcera corneal	1997
A25	Úlcera corneal	2001
A26	Úlcera corneal	2001
A27	Úlcera corneal	2001
A28	Lente de concato	2002
A29	Lentes de contacto	2003
A30	Aspirado de Absceso cerebral	2004
A31	Úlcera corneal	2007

En lo que se refiere a los resultados de la digestión de los productos de PCR de 700 pb pertenecientes al grupo III, no se observó correspondencia entre los productos de digestión con las enzimas *Hinf I*, *Hha I* y *Hae III* y los patrones publicados por Kong y Chung 1996 (17,18). Sin embargo, se pudo observar una similitud en los perfiles de digestión obtenidos luego de la acción de la enzima *Hinf I*, para los aislados A16, A17 y A10. Adicionalmente, entre estos últimos y los aislados A19 y A21, hubo una similitud entre 50% y 75% de los perfiles de digestión.

## DISCUSIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son conocidas como amibas anfizoicas, debido a la capacidad que tienen de existir como organismos de vida libre en la naturaleza, como ocasionalmente invadir un hospedero y vivir como parásito. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, por lo que los humanos estamos en frecuente contacto con estas ellas (1,19).

Las AVL se reconocen como parásitos emergentes, y se justifica su búsqueda, por el creciente número de usuarios de lentes de contacto y de personas inmunosuprimidas, así como las dificultades de diagnóstico y tratamiento<sup>(19)</sup>. Aunado a ésto, la creciente invasión humana de nuevos espacios perturbando los ecosistemas, que pueden afectar, la cantidad, la especie de microorganismos y sus nutrientes, lo que da la posibilidad de establecerse, colonizar y convertirse en patógenas para el hombre<sup>(20)</sup>. En consecuencia, todos éstos hechos nos obligan a continuar nuestros trabajos en el Laboratorio de Amibiasis y al perfeccionamiento de los métodos para evidenciarlos tempranamente.

Las amibas del género *Acanthamoeba* son las más frecuentes, incrementándose la prevalencia de la QA en las últimas décadas, con el aumento del uso de lentes de contacto<sup>(21)</sup>. Sin embargo, hay entidades patológicas de menor prevalencia que la QA pero de alto índice de mortalidad, debido al rápido progreso y gravedad de la enfermedad, como la EGA Y DA<sup>(22)</sup>.

En Venezuela, no había sido posible establecer la identificación de especies de aislados considerados como *Acanthamoeba* spp., bien por la forma heterogénea de presentación morfológica del protozoario o por no contar con la tecnología, herramientas, información o recursos necesarios para llevar a cabo tal objetivo. En la actualidad, el único centro de referencia para el estudio de las amibas de vida libre es el Laboratorio de Amibiasis de la UCV, donde se hace el diagnóstico de género por morfología y métodos de cultivo, aunque ya se han implementado las metodologías basadas en Biología Molecular, siendo pioneros en este tipo de estudios y resaltando la importancia del conocimiento de estos protozoarios en la epidemiología de nuestro país.

Para esta investigación se analizaron 24 aislados de *Acanthamoeba*, a los cuales se les realizó un análisis morfológico y molecular con la finalidad de establecer la especie de cada uno de ellos. El análisis morfológico se hace de rutina en nuestro laboratorio ya que con la identificación hasta género, es posible instaurar un tratamiento<sup>(4)</sup>. Kong HH, 2009, señala que la observación de los cultivos sigue siendo el método más usado y que deben usarse varios métodos simultáneos, para el hallazgo de *Acanthamoeba*, en la misma muestra<sup>(11)</sup> y otros autores consideran que aún se mantienen los criterios morfológicos de Pussard y Pons 1977 para la identificación morfológica.<sup>(9)</sup>

Ninguno de los aislados se ubicó dentro del grupo I según Pussard y Pons<sup>(10)</sup>, ya que todos los quistes median menos de 18um. La cantidad de puntas donde el ectoquiste hace contacto con el endoquiste y el aspecto del ectoquiste, permitió ubicar a los aislados dentro de los grupos II y III. Al relacionar la morfología de los quistes, con el tamaño de los productos de PCR obtenidos, se observó que existe concordancia entre la presencia de quistes lisos (grupo III) con un producto de 700 pb y la presencia de quistes festoneados o plegados (Grupo II), con la amplificación de un producto de 900 pb ( $p=0,005$ ).

Los aislados A1, A3, A10, A11, A16, A17, A18, A19, A20, A21 Y A22 se ubicaron en el grupo III, además comparten entre sí, la cualidad de que sus productos amplificados por PCR fueron de 700 pb; un tamaño en pb inferior al esperado de 900 pb, según Kong y Chung 1996<sup>(17)</sup>. El

otro grupo, correspondiente a los aislados A2, A9, A12, A13, A14, A15, A25, A26, A27, A28, A29, A30 y A31, mostraron características morfológicas distintas al grupo anterior: quistes con ectoquiste liso o plegado (en su mayoría plegados), significativamente con más puntas y trofozoítos relativamente más grandes, así como productos de amplificación por PCR para género de 900 pb. Tal heterogeneidad fue inesperada en los resultados a nivel molecular, ya que se escogió en la literatura los cebadores utilizados por Kong y Chung (17), debido a que para el género se podría esperar una pequeña variación entre 910 y 930 pb, para la mayoría de las especies de *Acanthamoeba*, excepto *A. astronixys*, en la cual se podría obtener un producto amplificado de 1170 pb.

Es posible que los resultados obtenidos para los aislados del grupo III, se deban a una alteración de la región altamente conservada que pudo haber modificado las características fenotípicas de estos aislados. Estadísticamente, se pudo observar una tendencia a obtener productos de PCR de 700 pb, en aislados mantenidos en cultivo más 10 años.

Una de las principales ventajas de realizar un estudio basado en el análisis del gen que codifica para la sub-unidad ribosomal, es que, al ser una estructura molecular que posee gran estabilidad con el paso del tiempo, presenta cambios estructurales pequeños e independientemente de éstos, es posible la identificación de especies, incluso aquellas estrechamente relacionadas. Sin embargo, numerosos estudios han comprobado que la porción analizada en este estudio (18S) poseen áreas de ADN no codificantes o intrones que pueden alterar la estructura genética, modificar el tamaño de los amplificados por PCR y por lo tanto afectar la correcta interpretación del mismo (17,18). Esto claramente, constituye un problema a la hora de comparar con los patrones de referencia y procurar la identificación de las especies.

Un factor posiblemente determinante en este estudio es la antigüedad de los aislados, pues estos protozoarios tienen la capacidad de cambiar sus características morfológicas y metabólicas de acuerdo al tiempo, temperatura de mantenimiento y las condiciones de cultivo (19).

La identificación de las especies mediante RFLP se logró en un 33% del total de los aislados seleccionados mantenidos en el Laboratorio de Amibiásis de la Escuela de Bioanálisis. Las especies identificadas fueron *A. castellani* para A26, A27, A28 y A29, *polyphaga* para A9, A12, A13 y A14 y se obtuvo patrones solapados, para A15, A25 y A30 impidiendo su identificación definitiva, siendo compatible con los patrones de *A. castellani* y *A. polyphaga*. Por otra parte, estos resultados se corresponden muy bien con las especies agrupadas por Pussard y Pons (10), que indican que las posibles especies para el género *Acanthamoeba* que exhibían características morfológicas compatibles con miembros del grupo II pueden ser *A. castellani* y/o *A. polyphaga*.

La clasificación de Pussard y Pons (10), además de diferenciar los quistes, logra agrupar ciertas especies, de modo que las que se encuentran en el grupo II comprenden un amplio grupo entre las que se hallan *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba castellanii*, y son en conjunto con las del grupo III, los patógenos más comúnmente aislados de muestras clínicas a nivel mundial (22).

El 50% de los aislados seleccionados para este proyecto, no presentó productos de digestión similares a los patrones de digestión con cada una de las enzimas publicadas por Kong y Chung 1996 (17). Sin embargo, algunos de los aislados con productos de PCR de 700 pb, generaron patrones de digestión semejantes entre sí con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Hae* III, aun cuando ésto no permitió su clasificación.

En el caso de A31, a pesar de que se obtuvo un producto de PCR de 900 pb, el rendimiento de RFLP no logró ajustarse tras varios intentos, habiendo esto impedido la posibilidad de la identificación.

Como se demuestra en este estudio, si bien no es posible determinar las especies de *Acanthamoeba*, sólo por el estudio microscópico, existen diferencias estructurales que avalan la clasificación de 1977, en grupos morfológicos y dichos grupos además presentan diferencias genéticas importantes, lo cual facilita la diferenciación y en último término la identificación y genotipificación de los mismos.

A futuro, en el Laboratorio de Amibiásis de la Escuela de Bioanálisis de la UCV, el estudio del genotipo, mediante la secuenciación del gen codificante del ARNr 18S de los aislados mantenidos, esclarecerá si éstos se corresponden con los genotipos más virulentos. Este hecho constituye un pilar relevante de la presente investigación, pues propone la posibilidad, de establecer un protocolo clínico que permita la instauración de la terapia adecuada en cada caso por el médico tratante, tal como lo sugiere Sissons y cols., (23) quienes establecen, que se requiere realizar pruebas moleculares para saber si la amiba encontrada pertenece a una especie patógena conocida y así conocer el riesgo para el paciente, sobre todo para usuarios de lentes de contacto.

## REFERENCIAS

- 1.- Visvesvara, G.S. & Stehr-Green, J.K. Epidemiology of free-living ameba infections. *J Protozool* 1990; 37: 25-33.
- 2.- Schuster, F.L., & Visvesvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1001-1027.
- 3.- Bermúdez A, Pérez de Galindo MV, Martínez Y, Pérez de Suárez E, Nieto T. Identificación de *Acanthamoeba* sp en tres pacientes con conjuntivitis. *An Inst Barraquer (BArc)* 1998; 27: 157-63.
- 4.-Visvesvara GS & Maguire JH. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea*. *Trop Infect Dis* 2006; 2:1114-25.
- 5.-Qvarnstrom Y, Da Silva AJ, Schusters FL, Gelman BB, Vivesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009; 199: 1139-42.

- 6.-Ozkoc S, Tuncay S, Delibas SB, Akisu C, Osbek Z, Durak I, Walochnic J. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 y *Paravahlkampfia* sp from two clinical samples. *J Med Microbiol* 2008; 57(pt 3): 392-6.
- 7.- Oddó, B.D. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Rev Chil Infect* 2006; 23: 200-14.
- 8.- Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens* 2007; 33: 1-8.
- 9.- Pérez de G MV, Galindo MV, Dorta A, Guzmán de R CT, Wagner C, Vethencourt MV, Nessi A, Bermúdez A, Pérez de S E. Hallazgos de Amibas de Vida libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana. *VITAE* 51, Julio-Septiembre 2012. Disponible: [http://vitae.ucv.ve/index\\_Pdf.php?module=articulo\\_pdf&n=4718&rv=1](http://vitae.ucv.ve/index_Pdf.php?module=articulo_pdf&n=4718&rv=1)
- 10.- Pussard, M. y Pons, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistologica* 1977; 13: 557-98.
- 11.- Kong HH. Molecular Phylogenetic *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 2009; 47:21-28.
- 12.- Lass A, Szostakowska B, Idzinska A. The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated natural water reservoirs in Poland. *Parasitol Res* 2014; 113: 2693-9.
- 13.-Kong H H. Molecular Phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 2009; 47: S21-S28.
- 14.-Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Leedee DR, Rodriguez-Zaragosa S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J eukaryote Microbiol* 1998; 45:45-54.
- 15.- Booton, C.G., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelley, D.J., & Fuerst, P.A. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1689-93.
- 16.- Koshler, M., Leitner, B., Blaschitz, M., Michel, R., Aspock, H.& Walochnik, J. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). *Parasitol Res* 2006; 98: 86-93.
- 17.- Kong H.H. y Chung D.I. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. *Korean J Parasitol* 1996; 34: 127-34.
- 18.- Kong H.H. y Chung D.I. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and 18S Small-Subunit Ribosomal DNA PCR-RFLP Analyses of *Acanthamoeba* Isolated from Contact Lens Storage Cases of Residents in Southwestern Korea. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1119-206.
- 19.-Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp as agent of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 273-307.

- 20.- Marcogliese D. Parasites of superorganism: Are they indicators of ecosystem health?. *Int Jparasitol* 2005; 35:705-16.
- 21.- Lorenzo-Morales J, Khan N, Walochnick J. An update on *Acatahmoeba* keratitis: pathogenesis and treatment. *Parasite* 2015; 22: 10.
- 22.- Schuster, F.L. y Visvesvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1001-27.
- 23.- Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Khan NA. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Microbial Pathogenesis* 2004; 37: 231-39.