

Artículo Original

Identificación de amebas de vida libre en agua y sedimentos en playas del litoral peruano

Identification of free-living amoebas in water and sediments on coastal beaches peruvian

<https://doi.org/10.52808/bmsa.8e7.632.018>

Miluska Frisancho Camero^{1,*}

<https://orcid.org/0000-0002-0202-0676>

Julissa Cruz Rosas²

<https://orcid.org/0000-0003-3995-7240>

Fabrizio Miguel Moreno Menéndez³

<https://orcid.org/0000-0001-8741-1192>

Ana María Isabel Vílchez Huerto⁴

<https://orcid.org/0000-0003-4666-3830>

Luis Giancarlo Torres Gamarra⁵

<https://orcid.org/0000-0002-9029-1491>

Recibido: 20/02/2023

Aceptado: 24/04/2023

RESUMEN

Se han identificado amebas de vida libre (AVL), como *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Vermamoeba*, tanto en entornos naturales como creados por el hombre, como aguas termales y spa. *Naegleria fowleri* causa meningoencefalitis amebiana primaria, mientras que *Acanthamoeba* y *Balamuthia* causan encefalitis granulomatosa crónica. *Acanthamoeba* también puede causar lesiones cutáneas y queratitis amebiana. Este estudio tuvo como objetivo identificar la presencia de estos protozoarios en 4 playas y sedimentos marinos del litoral peruano. Las muestras de agua de playa y sedimentos se recogieron en forma estéril y se trasladaron al laboratorio para la identificación de las AVL y, la determinación de la calidad bacteriológica de las muestras de agua. La AVL mayormente identificada fue *Acanthamoeba* tanto en las playas como en los sedimentos de Totorá, Boquerón, Talareño y Cangrejito, seguida de *Heteramoeba* y *Mayorella*. Aunque las infecciones debidas a amebas patógenas se consideran raras, recientemente, estas amebas mortales se detectaron en playas del litoral peruano. Esto es motivo de especial preocupación, especialmente porque el calentamiento global exacerba aún más el problema.

Palabras clave: amebas de vida libre, playas, sedimento marino, litoral peruano

ABSTRACT

Free-living amoebas (AVLs), such as Acanthamoeba, Naegleria, Balamuthia, and Vermamoeba, have been identified in both natural and man-made settings, such as hot springs and spas. Naegleria fowleri causes primary amebic meningoencephalitis, while Acanthamoeba and Balamuthia cause chronic granulomatous encephalitis. Acanthamoeba can also cause skin lesions and amoebic keratitis. This study aimed to identify the presence of these protozoa in 4 beaches and marine sediments on the Peruvian coast. The beach water and sediment samples were collected in a sterile manner and transferred to the laboratory for the identification of the AVL and the determination of the bacteriological quality of the water samples. The AVL most identified was Acanthamoeba both on the beaches and in the sediments of Totorá, Boquerón, Talareño and Cangrejito, followed by Heteramoeba and Mayorella. Although infections due to pathogenic amoebas are considered rare, these deadly amoebas have recently been detected on beaches along the Peruvian coast. This is of particular concern, especially as global warming further exacerbates the problem.

Keywords: free-living amoebas, beaches, marine sediment, peruvian coast

1Universidad Andina del Cusco, Cusco, Peru.

2Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

3Universidad Peruana Los Andes, Perú.

4Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

5Universidad Continental, Perú

*Autor de Correspondencia: mfrisancho@uamdina.edu.pe

Introducción

Las amebas de vida libre (AVL), son pequeños organismos parásitos anfizóicos oportunistas de vida libre que pueden sobrevivir y replicarse en el medio ambiente sin un huésped; se alimentan de bacterias, hongos y otras partículas, y son muy adaptables a su entorno. Entre los géneros descritos tenemos a *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Mastigina*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Vexillifera*. Se sabe que son omnipresentes y se encuentran en todo el mundo; estas pueden aislarse del aire, el suelo y el agua tanto de fuentes naturales como de sistemas de agua institucionales y domésticos (Thomas *et al.* 2006; Teixeira *et al.*, 2009). Entre los muchos géneros de AVL en la naturaleza, solo cuatro tienen una asociación con enfermedades humanas y animales, *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinia diploidea*. *N. fowleri* y varias especies de *Acanthamoeba* pueden causar una discapacidad del sistema nervioso central llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) y encefalitis amebiana

granulomatosa (EAG), respectivamente; ambas patologías en pacientes inmunocomprometidos. La MAP es una infección devastadora del cerebro causada por *N. fowleri* y se han notificado casos en varios países (Abrahams-Sandí *et al.*, 2015); estas infecciones también se han descrito en piel y senos paranasales. Particularmente *N. fowleri* ha sido la causa de infecciones mortales del SNC en niños y adultos jóvenes (CDC 2008; Yoder *et al.* 2009), y aunque la enfermedad es relativamente rara en comparación con su abundancia ambiental, estas nosologías causadas por AVL patógenas son graves, a menudo difíciles de tratar, y por lo tanto se hace imperante una comprensión más completa de su nicho ecológico y los lugares en los que las interacciones humanas con estas amebas se producen.

Por otra parte, *Acanthamoeba* es un género frecuente en aguas recreativas que también puede causar lesiones cutáneas y queratitis amebiana (QA) que se asocia con el uso de lentes de contacto o trauma corneal (Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007). Se ha descrito que la QA ocurre típicamente en personas sanas y puede resultar en discapacidad visual permanente o ceguera (Visvesvara *et al.*, 2007). Para esta patología se documentaron factores de riesgo como antecedentes de trauma, uso de lentes de contacto, natación o uso de aguas termales con lentes de contacto insertados (Kaji *et al.*, 2005). Por otra parte, y aunque se han realizado muchas investigaciones sobre aislamientos ambientales de *Acanthamoeba* desde que se describió la importancia médica de este género, solo se han informado 4 aislamientos en sedimentos oceánicos relacionados con esta ameba; a saber, *A. griffini* (Sawyer, 1971), *A. hatchetti* (Sawyer *et al.*, 1977), *A. jacobsi* (Sawyer *et al.*, 1992) y *A. stevensoni* (Sawyer *et al.*, 1993). Ahora bien, también se han reportados estudios que demuestran que algunas de las AVL tales como *Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba vermiformis* son conocidas por servir como hospedadores y vectores de diversos organismos intracelulares como Mimivirus, *Legionella pneumophila* y otros endosimbiontes (Siddiqui y Khan, 2012; Pagnier *et al.*, 2015). Por lo tanto, es crucial detectar rápidamente AVL en entornos acuáticos marinos recreativos donde las personas nadan y se bañan debido a su posible impacto en la salud humana. Este estudio tuvo como objetivo detectar e identificar la presencia de estos protozoarios en las aguas y sedimentos de playas del litoral peruano.

Materiales y métodos

Muestras de agua y sedimento de las playas

Las muestras de agua de playa se recolectaron de las cuatro localidades seleccionadas correspondientes a playas recreativas (Totorá, Boquerón, Talareño y Cangrejito). Se recogieron nueve muestras de la superficie del agua (<10 cm por debajo), cada una con una botella esterilizada de 1,5 l. En total se recogieron 13,5 l de agua de cada playa. Todos los frascos se transfirieron al Laboratorio para la identificación de las AVL. Simultáneamente se recolectaron muestras de un gramo de sedimentos marinos también en recolectores esteriles (Stockman *et al.*, 2011). Los valores de temperatura y pH de las muestras se midieron con un termómetro y un medidor de pH digital, respectivamente; además de se determinaron la concentración de oxígeno disuelto y la salinidad.

Procesamiento de las muestras, aislamiento e identificación de las amebas de vida libre

Se procesaron alícuotas de 50 ml de las muestras de agua, además de una porción del sedimento tras la centrifugación de la mezcla de 50g con 500 ml como se describe (Straus *et al.*, 1996). Las muestras se sembraron utilizando métodos descritos previamente (Barbaree *et al.*, 1986). El aislamiento de las amebas fue realizado por el laboratorio y la identificación de las especies de amebas fue realizada por personal capacitado para tal proceso. Las muestras se inocularon en placas de agar no nutritivo al 1,5% recubiertas con una capa de *Escherichia coli* inactivada por calor a 70°C por 15 minutos como fuente de alimento e incubadas a 25°C (temperatura ambiente). Las placas se examinaron todos los días con un microscopio invertido durante al menos 2 semanas para detectar la presencia de amebas (Bovee y Sawyer 1979), ya que las amebas medianas y grandes pueden aparecer sólo después de 1 a 2 semanas de cultivo (Sawyer *et al.*, 1977).

Si se observaban hongos en las placas, se procedió a cortar con un bisturí estéril pequeños trozos de agar en los que no había hifas fúngicas y se colocaron boca abajo en una placa de agar nueva recubierta con bacterias como se ha indicado anteriormente. Cuando se observaron trofozoítos y/o quistes, se recogieron con un asa bacteriológica estéril y se colocaron en un portaobjetos con una gota de solución salina fisiológica y se examinaron para ver su forma característica, el movimiento de los trofozoítos y la morfología de los quistes. Se clasificaron hasta el nivel de género. Las amebas y los quistes que mostraban morfología característica se subcultivaron en placas de agar frescas con el propósito de posterior identificación hasta el nivel de especie por métodos de moleculares.

Análisis de calidad bacteriológica de las muestras de agua

La enumeración de coliformes se realizó mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) (APHA, 2005). El método, en resumen, fue el siguiente: se usaron quince tubos de cultivo por muestra, donde cinco tubos contenían 10 ml estériles de concentración doble y diez tubos contenían 10 ml de caldo lauryl triptosa de concentración simple, todos los tubos con tubos Durham. Con una pipeta estéril, se dispensaron asépticamente 10 ml de la muestra de agua en cada uno de los primeros cinco tubos de cultivo que contenían el caldo lauryl triptosa de concentración doble. En el resto de los diez tubos que contenían lauryl triptosa estéril de concentración simple, se inoculó 1 ml de la muestra en cada uno de los

cinco tubos de cultivo, mientras que se inoculó 0,1 ml de muestra en los cinco tubos restantes. Los tubos se agitaron suavemente para distribuir la muestra uniformemente por todo el medio y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después, se observó el cambio de color (producción de ácido) o la formación de gas en los cultivos. Para la prueba de confirmación, se transfirió un asa llena de cultivo de los tubos de ensayo que mostraban producción de gas al tubo de caldo lactosa-bilis con verde brillante (LBVB) y se incubó durante 24 a 48 horas a 35°C. Los tubos que mostraban gas y crecimiento se consideraron positivos para coliformes totales (CT). Se siguió el mismo procedimiento para coliformes fecales (CF), excepto que los tubos se incubaron a 44,5°C para las pruebas de presunción y confirmación. Se comprobó la presencia de *Escherichia coli* en tubos positivos para CF sembrados en placas de azul de metileno con eosina y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La presencia de colonias bacterianas de color dorado verdoso brillante se tomó como evidencia de la presencia de *E. coli*; posterior a la confirmación bioquímica con las pruebas de Kligler e IMVIC.

Resultados

En las áreas de estudio la temperatura ambiental promedio fue cercana a 20°C en los cuatro sitios de muestreo; sin embargo, en parámetros como el oxígeno disuelto y salinidad presentaron variaciones entre las dos playas del mismo sitio de procedencia. El pH fue ligeramente básico en las muestras de agua correspondientes a las cuatro playas (Tabla 1).

Tabla 1. Variables fisicoquímicas del agua y sedimentos en playas del litoral peruano

Variable	Promedio de las variables fisicoquímicas			
	Huanchaco		Huanchaquito	
	Totora	Boquerón	Talareño	Cangrejito
Temperatura (°C)	20,00	19,90	19,90	19,80
Salinidad (UPS)	245,00	222,20	222,30	240,00
DBO (mg/L)	8,00	8,86	9,23	8,65
pH	7,40	7,30	7,30	7,30

De 158 aislados parasitarios se determinaron un total de 9 géneros de AVL colectados en el biotopo agua; y 8 en el sedimento, y los géneros más frecuentes identificados fueron *Acanthamoeba*, *Heteramoeba* y *Mayorella* en ambos tipos de muestras (Tabla 2). Resalta el hecho de que en ambos tipos de muestras el género parasitario con el mayor número de aislamientos fue *Acanthamoeba*, con 26 y 19 aislamientos en las muestras de agua de playa y sedimento, respectivamente. Organismos del género *Naegleria* sólo fueron identificados en las muestras de agua de playa.

Tabla 2. Prevalencia de géneros de amebas de vida libre en agua y sedimentos en playas del litoral peruano

Género	AVL			
	Agua		Sedimento	
	n°	%	n°	%
<i>Acanthamoeba</i>	26	43,33	19	31,67
<i>Heteramoeba</i>	19	31,67	17	28,33
<i>Mayorella</i>	14	23,33	9	15,00
<i>Naegleria</i>	9	15,00		
<i>Paramphitrema</i>	8	13,33	8	13,33
<i>Sappinia</i>	7	11,67	7	11,67
<i>Euglypha</i>	6	10,00	1	1,67
<i>Vannella</i>	5	8,33		
<i>Dactylamoeba</i>			1	1,67
<i>Rosculus</i>			1	1,67
<i>Vexillifera</i>	1	1,67		

Al evaluar la presencia de AVL según la playa podemos observar en la tabla 3, que las correspondientes a Huanchaco evidencian mayor infección en agua con 51,67 y 41,67%, y 28,66% y 36,67% en sedimentos para (Totora y Boquerón) respectivamente; mientras que, en Huanchaquito, 41,33% y 23,33% para agua y 18,33% y 23,33% para sedimento para las playas de Talareño y Cangrejito respectivamente.

Tabla 3. Presencia de géneros de amebas de vida libre en agua y sedimentos según la playa del litoral peruano

Género	Número de muestras positivas							
	Huanchaco				Huanchaquito			
	Totora		Boquerón		Talareño		Cangrejito	
	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento
<i>Acanthamoeba</i>	9	5	6	7	7	2	4	5
<i>Heteramoeba</i>		8	9	5	6	2	4	2
<i>Mayorella</i>	4		3	5	5	3	2	1
<i>Naegleria</i>	7		2					
<i>Paramphitrema</i>	4	2	1	2		2	3	2
<i>Sappinia</i>	1	1	2	2	4	2		2
<i>Euglypha</i>	1	1	1		3		1	
<i>Vannella</i>	4		1					
<i>Dactylamoeba</i>								1
<i>Rosculus</i>								1
<i>Vexillifera</i>	1			1				

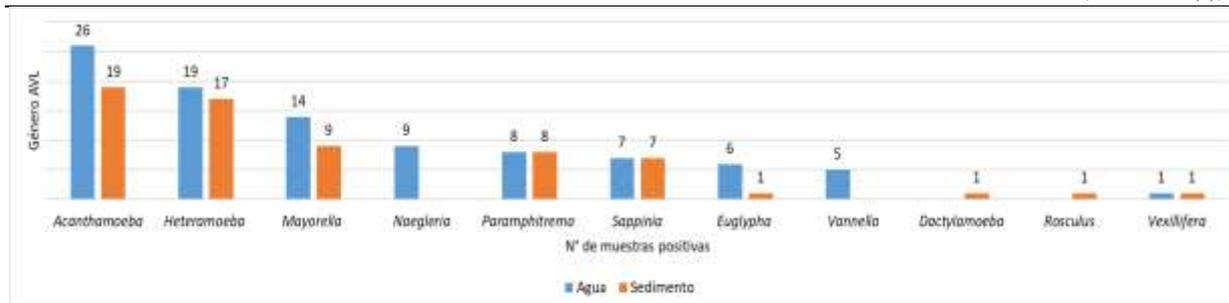


Figura 1. Abundancia de AVL según el sustrato de alojamiento

En cuanto a las bacterias aisladas e identificadas mediante las pruebas de NMP, IMVIC y Kligler, se obtuvieron un total de 360, 280, 230 y 320 UFC/100mL para *Klebsiella* y 260, 260, 280 u 340 UFC/100mL para *Escherichia coli.*, en las playas Totorá, Boquerón, Talareño y Cangrejito respectivamente.

Discusión

Las AVL se caracterizan por una sólida capacidad para sobrevivir en entornos extremos. Sin embargo, actualmente no existe información actualizada sobre la existencia y distribución de este protozooario en lugares inhóspitos. Sin duda, la fisiología celular de estos microorganismos protozoarios es muy particular. Pueden resistir y vivir en ambientes extremos por su capacidad enquistadora y tolerancia a diferentes osmolaridades, temperaturas, y otros factores ambientales, que les confieren una excelente resistencia adaptativa (Salazar-Ardiles *et al.*, 2020). En consecuencia, el ambiente marino es uno de los pocos estudiados en relación a la determinación de estos protozoarios y es indiscutible el aumento del uso del mar para la recreación, lo cual ha generado una gran preocupación por los peligros para la salud de las poblaciones locales y turísticas (Fewtrell y Kay, 2015).

La presencia de amebas de vida libre patógenas en agua de mar se ha confirmado en algunas partes del mundo (Latifi *et al.*, 2020; Gallegos *et al.*, 2018). En nuestro estudio se identificaron 9 diferentes géneros correspondientes a estas amebas en las muestras de agua de playa; mientras que en las muestras de sedimento marino se lograron identificar 8 géneros. Vale decir que, el género mayormente reconocido en ambos tipos de muestra fue *Acanthamoeba*, y sabiendo que las diversas especies pertenecientes a este género se encuentran en diversos hábitats, no es sorprendente que a menudo nos encontremos e interactuemos con estos organismos. Previamente, Chappell *et al.* (2001) mostró que más del 80% de la población humana normal exhibió anticuerpos contra *Acanthamoeba*. Esto indicaba claramente que se trata de organismos que a menudo entran en contacto con los seres humanos.

La patogenicidad de *Acanthamoeba* es una suma de múltiples procesos que deben unirse en el tiempo y el espacio para la transmisión exitosa de patógenos a un hospedador susceptible, superar las barreras de este y causar enfermedades. Puede infectar el SNC, causando EAG, y los ojos, lo que lleva a una infección devastadora conocida como QA, y puede causar infecciones secundarias (principalmente bacterianas) que han alterado los tejidos, especialmente la piel en individuos inmunocomprometidos (Grün *et al.*, 2014; Mungroo *et al.*, 2019). Es ampliamente reconocido que la vía de entrada de *Acanthamoeba* involucra el tracto respiratorio, lo que lleva a la invasión de los vasos sanguíneos alveolares, seguida de diseminación hematológica y que la barrera hematoencefálica es donde es más probable que ocurra la entrada al SNC (Visvesvara *et al.*, 2007). Hallazgos recientes sobre los factores y mecanismos involucrados en la patogenia de *Acanthamoeba* puede proporcionar herramientas para el desarrollo de estudios epidemiológicos y terapéuticos (Alsam *et al.* 2003; Khan 2003; Khan y Tareen 2003). De ahí que, nuestros hallazgos sean considerados por los entes gubernamentales competentes en el saneamiento ambiental y de los recursos naturales como lo son las playas, ya que en los cuatro balnearios marinos del estudio (Totorá, Boquerón, Talareño y Cangrejito), presentaron aislamientos positivos para esta ameba de vida libre tanto en las muestras de agua de playa como en los sedimentos marinos.

Las playas son sitios característicos para la recreación humana. Al obtener el patrocinio de los turistas locales e internacionales, podría decirse que las playas sustentan el desarrollo económico, ya que respaldan los desarrollos comerciales y el turismo en las áreas costeras (Klein *et al.*, 2004). Dada la intensa demanda, las playas están amenazadas en todo el mundo por una variedad de presiones humanas, incluida la contaminación costera de cursos industriales y antropogénicos, además de los efectos del cambio climático global (Schlacher *et al.*, 2006). A esta presión se suma el crecimiento cada vez más rápido de las poblaciones costeras, junto con una mayor disponibilidad de tiempo libre (Fanini *et al.*, 2006; Schlacher *et al.*, 2007).

Conflicto de intereses

No se reporta conflicto de intereses.

Agradecimientos

A Dios.

Referencias

- Abrahams-Sandí E, Retana-Moreira L, Castro-Castillo A, Reyes-Batlle M, & Lorenzo-Morales J. (2015). Fatal meningoencephalitis in child and isolation of *Naegleria fowleri* from hot springs in Costa Rica. *Emerg Infect Dis.* 21(2):382-4. <https://doi.org/10.1007/10.3201/eid2102.141576>
- APHA. (2005). Twenty-first ed. American Public Health Association; Washington, DC. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Disponible en: [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1870039](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1870039) (Acceso marzo 2023).
- Barbaree, J. M., Fields, B. S., Feeley, J. C., Gorman, G. W., & Martin, W. T. (1986). Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and environmental microbiology*, 51(2), 422–424. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.422-424.1986>
- Bovee, E., & Sawyer, T.K. (1979). National oceanic and atmospheric administration technical report. In: Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States. Protozoa: Sarcodina: Amoeboae. National Marine Fisheries Service Circular. United States Department of Commerce, Washington, DC. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/63225> (Acceso marzo 2023).
- CDC (2008). Primary amebic meningoencephalitis—Arizona, Florida, and Texas, 2007. *Morb Mortal Wkly Rep* 57:573–577. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5721a1.htm> (Acceso enero 2023).
- Chappell, C. L., Wright, J. A., Coletta, M., & Newsome, A. L. (2001). Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(4), 724–730. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.724-730.2001>
- Fanini, L., Scapini, F., & Khattabi, A. (2006). Sandhopper orientation integrates environmental information. Preliminary considerations on the case-study of Laou River mouth, Morocco. In: Scapini, F. (Ed.), *MEDCORE Proceedings*. Firenze University Press, pp. 185–197.
- Fewtrell, L., & Kay, D. (2015). Recreational Water and Infection: A Review of Recent Findings. *Curr Environ Health Rep.* 2(1):85-94. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0036-6>
- Gallegos, M., Becerra, J., Figueroa, M., Fuentes, S., Hernández, A., & Mendoza, M. (2018). Amibas de vida libre en playas de Tuxpan y Arrecife Ingeniero, Veracruz, México *Revista de Zool.* (29),1-5. Disponible en: <https://www.revistazoologia.com/2-21/NO.%2029-%202018/AMIBAS.pdf> (Acceso febrero 2023).
- Grün, A., Stemplewitz, B., & Scheid, P. (2014). First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. *Parasitology Research*, 113(6), 2395-2400. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3918-5>
- Kaji, Y., Hu, B., Kawana, K., & Oshika, T. (2005). Swimming with soft contact lenses: danger of *Acanthamoeba* keratitis. *Lancet Infectious Diseases*, 5(6), 392. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(05\)70143-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(05)70143-2)
- Klein, Y. L., Osleeb, J. P., & Viola, M. R. (2004). Tourism-Generated Earnings in the Coastal Zone: A Regional Analysis. *Journal of Coastal Research*, 2004(204), 1080. <https://doi.org/10.2112/003-0018.1>
- Latifi, A., Salami, M., Kazemi-Rad, E., & Soleimani, M. (2020). Isolation and identification of free-living amoeba from the hot springs and beaches of the Caspian Sea. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00151. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e0015>
- Mungroo, M. R., Anwar, A., Khan, K. M., & Siddiqui, R. (2019). Brain-eating Amoebae Infection: Challenges and Opportunities in Chemotherapy. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 19(12), 980-987. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190313161854>
- Pagnier, I., Valles, C., Raoult, D., & La Scola, B. (2015). Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microbial Pathogenesis*, 80, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.02.006>
- Salazar-Ardiles, C., Asserella-Rebollo, L., & Andrade, D. C. (2022). Free-Living Amoebas in Extreme Environments: The True Survival in our Planet. *BioMed Research International*, 2022, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2022/2359883>
- Sawyer, T. (1971). *Acanthamoeba griffini*, a new species of ocean amoeba. *J Protozool.* 18: 650-654. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03391.x> (Acceso abril 2023).
- Sawyer, T. H., Visvesvara, G. S., & Harke, B. A. (1977). Pathogenic Amoebas from Brackish and Ocean Sediments, with a Description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science*, 196(4296), 1324-1325. <https://doi.org/10.1126/science.867031>

- Sawyer, T., Nerad T., & Visvesvara, G. (1992). *Acanthamoeba jacobsi* sp. n. (Protozoa: Acanthamoebidae) from sewage contaminated ocean sediments. *J Helminthol Soc Wash.* 59: 223-226.
- Sawyer, T., Nerad, T., Lewis, E., & McLaughlin, S. (1993). *Acanthamoeba stevensoni* n. sp. (Protozoa: Amoebida) from sewage- contaminated shellfish beds in Raritan Bay, New York. *J Eukaryot Microbiol.* 40: 742-746. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04469.x> (Acceso marzo 2023).
- Schlacher, T. A., Schoeman, D. S., Lastra, M., Jones, A. M., Dugan, J. E., Scapini, F., & McLauchlan, A. J. (2006). Neglected ecosystems bear the brunt of change. *Ethology Ecology & Evolution*, 18(4), 349-351. <https://doi.org/10.1080/08927014.2006.9522701>
- Schlacher, T. A., Dugan, J. E., Schoeman, D. S., Lastra, M., Jones, A. M., Scapini, F., McLachlan, A., & Defeo, O. (2007). Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distributions*, 13(5), 556-560. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00363.x>
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9), 1001-1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>
- Siddiqui, R., & Khan, K. M. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>
- Stockman, L. J., Wright, C., Visvesvara, G. S., Fields, B. S., & Beach, M. L. (2010). Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA—1990–1992. *Parasitology Research*, 108(3), 621-627. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2120-7>
- Straus, W. L., Plouffe, J. F., File, T. M., Jr, Lipman, H. B., Hackman, B. H., Salstrom, S. J., Benson, R. F., & Breiman, R. F. (1996). Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Archives of internal medicine*, 156(15), 1685–1692. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8694667/> (Acceso marzo 2023).
- Teixeira, L.H., Rocha, S., Pinto, R.M., Caseiro, M.M., & Costa, S.O. (2009). Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in non-hospital, public, internal environments from the city of Santos, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 13(6):395-7. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702009000600001>
- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S., & Greub, G. (2006). Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2428-2438. <https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2428-2438.2006>
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 50(1), 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>
- Yoder, J. S., Eddy, B. A., Visvesvara, G. S., Capewell, L., & Beach, M. J. (2010). The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiology and infection*, 138(7), 968–975. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991014>