

Artículo Original

Identificación de amebas de vida libre en tanques de almacenamiento de agua de edificios del área metropolitana de Ambato

Identification of free-living amoebas in water storage tanks of buildings in the metropolitan area of Ambato

<https://doi.org/10.52808/bmsa.7e6.626.015>

Yarintza Coromoto Hernández Zambrano ^{1,*}

<https://orcid.org/0000-0002-9524-3325>

Elisabeth Germania Vilema Vizuete ¹

<https://orcid.org/0000-0002-2348-4330>

Cesar Augusto Intriago Núñez ¹

<https://orcid.org/0000-0003-1052-7677>

Olga Mireya Alonzo Pico ¹

<https://orcid.org/0000-0002-8535-884X>

Recibido: 19/05/2022

Aceptado: 28/10/2022

RESUMEN

Naegleria fowleri, *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris*, son especies de ameba de vida libre (AVL) que causan enfermedades en el sistema nervioso central grave y puede ser fatal en humanos y otros animales. Todos los géneros de AVL tienen dos etapas: quiste y trofozoíto. Los trofozoítos se dividen por fisión binaria, se alimentan activamente y es la etapa infecciosa del organismo. En el medio ambiente, los acanthopodios permiten que los trofozoítos se adhieran a las superficies de las bacterias, hongos, algas y detritos en los que se encuentran su alimento. *Acanthamoeba* spp. Parecen mantener una relación endosimbiótica con algunas de las bacterias que consumen. Muchas de estas bacterias, como la *Legionella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y algunas micobacterias parecen adquirir factores de virulencia mientras están viviendo dentro de las amebas, lo que les permite sobrevivir y prosperar dentro de otras células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos humanos). La tenacidad de AVL para proliferar en ecosistemas hostiles y sobrevivir a la desecación o desinfección hace de estos organismos una fuente potencial transmitida por el agua, por los alimentos y el aire. Conocidos por su ubicuidad, los AVL han sido aislados de diversas matrices ambientales, como suelo, agua dulce y salobre, aguas residuales, aguas termales, polvo y otros. En función de lo antes comentado, este trabajo tiene como objetivo identificar amebas de vida libre en tanques de almacenamiento de agua de edificios del área metropolitana de la ciudad de Ambato (Ecuador), con el fin de aplicar soluciones correctivas en cualquiera de sus puntos. Según el sitio de muestreo, el género de AVL identificado con mayor frecuencia en la superficie fue *Balamuthia* sp (70,59%) y *Acanthamoeba* sp., con un 37,78 %. El fondo estuvo caracterizado por *Naegleria* sp. con un 44,44%.

Palabras clave: ameba de vida libre, edificios residenciales, tanque de agua potable, asociación con bacterias.

ABSTRACT

Naegleria fowleri, *Acanthamoeba* spp. and *Balamuthia mandrillaris* are species of free-living amoeba (FLA) that cause severe central nervous system disease and can be fatal in humans and other animals. All genera of FLA have two stages: cyst and trophozoite. Trophozoites divide by binary fission, actively feed, and is the infective stage of the organism. In the environment, acanthopods allow trophozoites to adhere to the surfaces of bacteria, fungi, algae, and detritus on which their food is found. *Acanthamoeba* spp. they appear to maintain an endosymbiotic relationship with some of the bacteria they consume. Many of these bacteria, such as *Legionella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, and some mycobacteria appear to acquire virulence factors while living inside amoebas, allowing them to survive and thrive inside other phagocytic cells (eg, human macrophages). FLA's tenacity to proliferate in hostile ecosystems and survive desiccation or disinfection makes these organisms a potential waterborne, foodborne, and airborne source. Known for their ubiquity, FLAs have been isolated from various environmental matrices, such as soil, fresh and brackish water, wastewater, hot springs, dust, and others. Based on the aforementioned, this work aims to identify free-living amoebas in water storage tanks of buildings in the metropolitan area of the city of Ambato (Ecuador), in order to apply corrective solutions at any of its points. According to the sampling site, the FLA genus most frequently identified on the surface was *Balamuthia* sp (70.59%) and *Acanthamoeba* sp., with 37.78 %. The background was characterized by *Naegleria* sp. with 44.44%

Keywords: free-living amoeba, residential buildings, drinking water tank, association with bacteria.

¹ Universidad Regional Autónoma de los Andes, UNIANDES, Ecuador.

*Autor de Correspondencia: ua.yarintzahernandez@uniandes.edu.ec

Introducción

Naegleria fowleri, *Acanthamoeba* spp. Y *Balamuthia mandrillaris* son especies de ameba de vida libre (AVL) que causa enfermedades en el sistema nervioso central grave y puede ser fatal en humanos y otros animales (Visvesvara et al., 2007). El nombre *Balamuthia* se derivó en honor al parasitólogo William Balamuth, mientras que *Naegleria* lleva el nombre del zoólogo Mathieu Naegler. *Acanthamoeba* spp. reciben su nombre de las proyecciones de la columna vertebral, conocidas como acanthopodia ("acanto"significa "espina dorsal" en griego), que están presentes en los trofozoítos. El género *Sappinia* también es incluido como AVL, aunque hasta la fecha solo se ha publicado un caso

humano. Estos protozoos también pueden causar queratitis, así como infecciones de la piel y las mucosas. AVL produce infecciones como patógenos oportunistas tanto en personas inmunocompetentes como inmunodeprimidas. Estas amebas pueden ser difíciles de diagnosticar clínicamente, ya que estas infecciones son raras; sino son sospechadas, pueden ser mal diagnosticadas o no ser diagnosticadas hasta que se realiza una autopsia, ya que muchos de ellas son fatales. La microscopía sigue siendo el principal medio de diagnóstico método; sin embargo, la experiencia con estos patógenos es poco frecuente y requiere consulta con expertos, lo que frecuentemente retrasa el diagnóstico (Cope *et al.*, 2019).

Todos los géneros de AVL tienen dos etapas: quiste y trofozoíto. *N. fowleri*, además, tiene una tercera etapa flagelada (Visvesvara *et al.*, 2007). Los trofozoítos se dividen por fisión binaria, se alimentan activamente y es la etapa infecciosa del organismo. En el medio ambiente, los acanthopodios permiten que los trofozoítos se adhieran a las superficies de las bacterias, hongos, algas y detritos en los que se encuentran su alimento (Duggal *et al.*, 2017). *Acanthamoeba spp.* Parecen mantener una relación endosimbiótica con algunas de las bacterias que consumen. Muchas de estas bacterias, como la *Legionella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y algunas micobacterias parecen adquirir factores de virulencia mientras están viviendo dentro de las amebas, lo que les permite sobrevivir y prosperar dentro de otros fagocíticos celulares (por ejemplo, macrófagos humanos). AVL también proporciona a estas "bacterias resistentes a la ameba" protección a las respuestas inmunitarias humanas cuando se inhalan o se ingieren, actuando como caballos de Troya para agentes infecciosos como *Legionella* y otros (Kofman & Guarmer, 2022).

La tenacidad de AVL para proliferar en ecosistemas hostiles y sobrevivir a la desecación o desinfección hace de estos organismos una fuente potencial transmitido por el agua, por los alimentos y el aire (Scheid, 2018). Conocidos por su ubicuidad, los AVL han sido aislados de diversas matrices ambientales, como suelo, agua dulce y salobre, aguas residuales, aguas termales, polvo y otros (Balczun & Schei, 2017; Gabriel *et al.*, 2019; Fabros *et al.*, 2021). Aparte de las fuentes ambientales, también se ha informado que los AVL pueden hallarse en torres de enfriamiento, sistemas de aire acondicionado, plantas de bromelias, suministros de agua dental, y se sabe que contaminan lentes de contacto y líquidos para lentes (Vaerewijck *et al.*, 2014; Giovanni *et al.*, 2022). Por otra parte, el agua del grifo para muchas instalaciones públicas, así como grandes edificios residenciales y de oficinas, se almacena en tanques de almacenamiento y se suministra a través de tuberías de aguas individuales cuando se necesita para actividades como beber, lavar y cocinar (National Research Council, 1982). Estos tanques de almacenamiento de agua pueden infectarse fácilmente con contaminantes externos en el aire. Además, circunstancias especiales, tales como inundaciones y fuertes lluvias, pueden causar que las aguas residuales fluyan de los tanques de agua del sótano a los tanques de agua de la azotea, lo que resulta en una contaminación extrema del agua del grifo (Kilvington *et al.*, 2004). Por esta razón, el 79% de EE. UU. Y el 89% del Reino Unido han informado que las muestras de agua del grifo de los hogares contienen AVL (Kilvinton *et al.*, 2004; Marciano *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2020).

En función de lo antes comentado, este trabajo tiene como objetivo identificar amebas de vida libre en tanques de almacenamiento de agua de edificios del área metropolitana de la ciudad de Ambato (Ecuador), con el fin de aplicar soluciones correctivas en cualquiera de sus puntos.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 45 edificios residenciales del área metropolitana de Ambato, Ecuador de diferentes zonificaciones los cuales contaban con tanques subterráneos para el abastecimiento de agua potable.

La recolección de las muestras se realizó utilizando frascos de vidrio de un litro estériles con tapa roscada sujetos a cordeles para su inmersión en los tanques. De cada cordel se sujetaron cuatro frascos con una separación de 30 cm cada uno para asegurar tomas de muestras a diferentes profundidades. Las muestras colectadas se enviaron al laboratorio, donde se tomaron dos alícuotas de 500 ml cada una para el aislamiento. Las amebas fueron crecidas en cultivo Page, y el resto para la infección de los sedimentos con la finalidad de conocer la biodiversidad presente y determinar la presencia de organismos parasitarios.

Examen directo

Para los montajes en fresco se centrifugaron 2ml de la muestra a 2500rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado y una gota del sedimento se depositó en láminas de vidrios cubiertas de laminillas para su observación directa al microscopio bajo objetivos de aumento de 10 X y 40 X. La identificación de las AVL se hizo a partir de su morfología según los rasgos taxonómicos propuestos por (Botero, 2003; Muñoz *et al.*, 2003; Castrillón & Orozco, 2013) de acuerdo con sus características típicas de los trofozoítos: tamaño de 13 a 30 micrómetros, presencia de bacterias intracelulares y mecanismos de locomoción (lobopodias o acantapodios) y núcleo con un cariósoma prominente rodeado por un halo claro. En el caso de los quistes se tuvo en cuenta el número de membranas, determinando si la estructura parasitaria correspondía a una ameba de vida libre.

Aislamiento de AVL

El aislamiento se realizó en función al tamaño celular para quiste de 7 a 15 μm y trofozoíto de 15 a 30 μm mediante decantado en filtros de membrana de nitrocelulosa de 45 micras de diámetro de poro y un diámetro de 25nm colocados en portafilos de propileno adaptables a jeringas estériles de volumen para filtrado manual.

Cultivo de AVL

Siguiendo los criterios de (Schuster, 2002) los filtros se colocaron en ormas invertidas por duplicado en dos placas estériles descartables con medio de Agar No Nutritivo (ANN) (Tabla 1), adicionando 25µL de solución de Page con *Eshericha coli*, las cuales fueron inactivadas con calor; posteriormente se incubaron a 37°C por 7 días de forma invertida.

Tabla 1. Formulación de medio de ANN y solución PAGE de AVL.

Medio Page		Soluciones Page (1 L)	
Ingredientes por litros de agua desionizada		Ingredientes por litros de agua desionizada	
Reactivo	Cantidad (g)	Reactivo	Cantidad (g)
Fosfato de sodio	0,0142	Fosfato de sodio	0,0142
Fosfato de potasio	0,0136	Fosfato de potasio	0,0136
Cloruro de sodio	0,012	Cloruro de sodio	0,012
Sulfato de magnesio	0,0004	Sulfato de magnesio	0,0004
Cloruro de calcio	0,0004	Cloruro de calcio	0,0004
Agar agarosa	15,0	Agar agarosa	15,0
pH final: 7,0±0,2 a 25 °C		pH final: 7,0±0,2 a 25 °C	

La identificación de los microorganismos se realizó mediante la inspección microscópica, para ello, las placas de cultivo se cortaron de manera manual con bisturí en cuadros de 2 cm² aproximadamente. Luego, cada cuadro se colocó en un portaobjeto, coloreándolo con Giensa antes de cubrirse. La observación se realizó en microscopio óptico invertido utilizando los objetivos con aumento de 40 y 100x para identificar las características de morfológicas.

Prueba de sedimentación para la diversidad biológica

El sedimento se obtuvo por centrifugación de una muestra de 500ml a 3000rpm por durante 15 minutos. El sedimento colectado se colocó en agitador vórtex por 3 segundos para homogenizar la muestra. La observación se realizó por el método de frotis directo usando una muestra de 25 microlitro.

Los sedimentos también fueron analizados usando el método de Richard modificado para su aplicación a heces humanas usando el siguiente protocolo: se suspendió el sida mentol obtenido de 10ml de agua desionizada histórica una temperatura de 45 minutos con el agitador vortex y posteriormente se centrifugo a 2500 revoluciones por minuto durante un minuto se desecha el sobrenadante y el sedimento de 100 ML de agua desionizada estéril de 45 grados.

Análisis de datos

Los datos parasitológicos arrojados fueron organizados bajo el programa Microsoft Excel® para su interpretación mediante tablas y gráficos de acuerdo con el porcentaje de ameba de vida libre según la zonificación hecha en la toma de datos según las diferentes profundidades del tanque en las tres fuentes de agua.

Resultados

De la totalidad de los 45 puntos muestreados, el 48,89% resultaron positivas para una o más AVL. Según la Tabla 2, el genero *Acanthamoeba* sp. Fue el mas frecuente (48,89%); seguido de *Naegleria* sp. (44,44%) y *Balamuthia* sp con 31,11%. Respecto la ocurrencia, según la frecuencia de limpieza de los tanques, se estimó que a mayor tiempo de limpieza hay mayor probabilidad de presencia de AVL, incrementando al superar la frecuencia de limpieza mayor a un año.

Morfológicamente de los microorganismos cultivados, se caracterizó el genero *Acanthamoeba* porque los trofozoítos son pleomórficos, con vacuolas contráctiles,seudópodos con apariencia de espinas (acantópodos) que se proyectan de la superficie de la célula; su núcleo contiene un nucléolo grande, central y con tamaño entre 15 y 30 µm de acuerdo con la especie, mientras que los quistes son esféricos de doble pared (endo- y ectoquiste), la pared externa es lisa y la interna poligonal, estelar o globular, además de presentar poros y su tamaño oscila entre 10 y 15 µm para sus quistes o trofozoítos (Page, 1976). No se encontraron muestras positivas presuntivas para *Naegleria fowleri* ni *Balamuthia* sp. en cultivo.

Tabla 2. Presencia de AVL en tanques de almacenamiento de agua de edificios residenciales según la frecuencia de limpieza.

Tanque	Limpieza	Nº	AVL					
			<i>Acanthamoeba</i> sp.		<i>Naegleria</i> sp.		<i>Balamuthia</i> sp.	
			nº	%	nº	%	nº	%
	6 meses o menos	13	6	13,95	4	9,30	4	9,30
	6 a 12 meses	27	12	44,44	13	48,15	8	29,63
	más de 12 meses	5	4	80,00	3	60,00	2	40,00
	Total	45	22	48,89	20	44,44	14	31,11

Según el sitio de muestreo (Tabla 3), el género de AVL identificado con mayor frecuencia en la superficie fue *Balamuthia* sp. (70,59%) y *Acanthamoeba* sp., con un 37,78%. El fondo estuvo caracterizado por *Naegleria* sp. con un 44,44%.

Tabla 3. Presencia de AVL según el nivel de agua en tanques de almacenamiento de edificios residenciales

Tanque		AVL					
Nivel	Nº	<i>Acanthamoeba</i> sp.		<i>Naegleria</i> sp.		<i>Balamuthia</i> sp.	
		nº	%	nº	%	nº	%
Superficie/borde	45	17	37,78	5	11,11	12	70,59
Medio	45	5	11,11	2	4,44	2	26,67
Fondo	45						
Total				13	28,89		4,44

En los sedimentos se estimó la diversidad biológica (Figura 1). Entre los organismos patógenos más abundantes se encontraron *Strongyloides stercoralis* (3 individuos), *Toxocara* sp., *Endolimax nana* y *Hymenolepis nana* (2 individuos cada una). Entre los microorganismos no patógenos están *Phacus* sp. (19 individuos), *Westella botryoides* (24 individuos), *Haematococcus* sp. (25 individuos) y *Euglena* sp. (17 individuos).

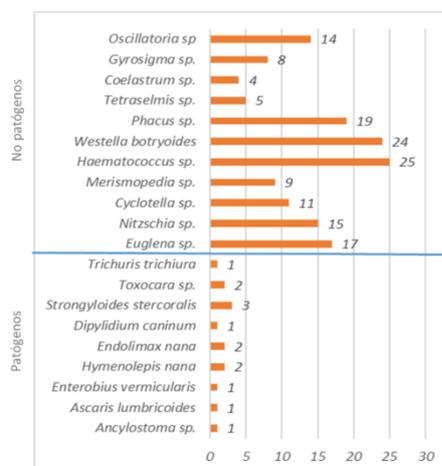


Figura 1. Frecuencia de microfauna en sedimentos.

Discusión

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos ubicuos similares a bacterias, hongos y algas. Los AVL se encuentran en nuestro alrededor, incluido el polvo, el agua de mar, el suelo, la atmósfera y los lagos (Greub & Raoult, 2004). Los AVL se clasifican en varias especies. De estas especies, *Balamuthia*, *Naegleria*, *Sappinia*, *Vermamoeba* (anteriormente *Hartmannella*), y *Acanthamoeba* han sido reportados para infectar a humanos y animales (Shuster & Visversvara, 2004). Los síntomas de las infecciones varían según el caso individual y la especie de AVL (Martinez, 1985). En el caso de infección por *Naegleria* en humanos, se ha observado encefalitis, como la cefalitis meningóide amebiana primaria. Las infecciones por *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Sappinia* y *Balamuthia* se han observado principalmente en los ojos, una condición conocida como queratitis amebiana (Grace *et al.*, 2015). En estudios recientes, *Acanthamoeba* también se ha observado como uno de los posibles alérgenos que conducen a la inflamación de las vías respiratorias por infección intranasal (Park *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2020).

Los resultados demostraron que, en los tanques de almacenamiento de agua potable de 45 edificios de la zona residencial de Ambato, Ecuador, de los 45 puntos estudiados, el 48,89% resultaron positivos para una o varias especies de AVL. El género de mayor prevalencia fue *Acanthamoeba* sp, seguido de *Naegleria* sp. Y por último de *Balamuthia* sp (Tabla 2). La ocurrencia de este tipo de AVL fue más frecuente en los tanques con menor tiempo de limpieza. Las AVL pueden causar enfermedades graves en humanos y animales cuando se infectan. Un estudio llevado en Corea del Sur, en 163 muestras de agua del grifo de edificios, apartamentos y baños de áreas de servicio de autopistas en 7 provincias coreanas con alta densidad de población servida con tanques subterráneos, encontraron que el 12,9% del agua del grifo de los edificios estaban contaminados con AVL. Las áreas de servicio de la carretera tuvieron la tasa de contaminación más alta con un 33,3%. Todos los AVL, excepto uno, eran genéticamente similares a *Vermamoeba vermiformis* (*Hartmannella vermiformis*). El AVL restante fue muy similar a *Acanthamoeba lugdunensis* (Lee *et al.*, 2020). Los estudios llevados a cabo por Burak & Zeybek, (2014) determinaron la presencia de *Legionella pneumophila* y amebas de vida libre en hisopos provenientes de duchas del cabezal de agua caliente en 61 casas en Estambul. Las bacterias fueron aisladas en el 21,3% de las viviendas examinadas y AVL en el 31% de las casas estudiadas. No se encontró una correlación significativa entre la presencia de *L. pneumophila* y AVL, pero si hubo una mejor correlación entre *L. pneumophila* y la presencia del sistema de calefacción central. Según los resultados del presente estudio, tanto

las duchas de agua como los tanques de agua se habían limpiado un mes antes y los cabezales de ducha se habían lavado tres días atrás. Un estudio reciente llevado a cabo por (Sousa *et al.*, 2022) encontraron que el agua potable en diferentes puntos de la isla de Santiago, Cabo Verde, África, estaba contaminada con *Acanthamoeba spp.* (69,2%), *Vannella spp.* (15,4%); *Vermamoeba vermiformis* (7,7%) y *Stenamoeba dejonckheerei* (7,7%) en diferentes fuentes de agua de Santiago Isla. Hasta el momento, en Europa y África, no existe una legislación relacionada con la presencia de AVL en cuerpos de agua. Sin embargo, en Australia, la Dirección de Agua Potable donde reúnen las Estrategias Nacionales de Gestión de la Calidad del Agua no existe un valor de referencia para las especies de *Acanthamoeba*, *Vannella*, *V. vermiformis* y *Stenamoeba* en agua potable, inclusive *Acanthamoeba* y *Vannella* son nombradas de manera diferente (Australia drinking water, 2011). En Filipinas, los problemas de contaminación del agua potable tienen efectos perjudiciales para el consumo humano y la productividad acuícola (Andrews, 2018). La contaminación descontrolada de sistemas de agua dulce en el país es debido al vertido indiscriminado de aguas residuales industriales y domésticas a ríos y otros sistemas de almacenaje de agua dulce. El paisaje urbano cambia frecuentemente y se expande causando la escorrentía del suelo y los desafíos provocados por las condiciones climáticas extremas y los factores asociados al cambio climático son factores que contribuyen a la propagación de los patógenos transmitidos por el agua (Semenza, 2020). La investigación de AVL en el Filipinas todavía está en sus inicios, pero hasta la fecha, hay dos casos de encefalitis fatal relacionada con la presencia de AVL (Matias *et al.*, 1991) y 12 casos de infecciones oculares no fatales (Buerano *et al.*, 2014; Milanez *et al.*, 2022).

Por otra parte, los resultados de convivencia entre las amebas de vida libres y otras bacterias pudieron también ser determinados en los tanques de agua de almacenamiento de los edificios de Ambato. Los sedimentos colectados se estimó la diversidad biológica (Figura 1) encontrándose organismos patógenos tales como *Strongyloides stercoralis* (3 individuos), *Toxocara sp.*, *Endolimax nana* y *Hymenolepis nana* (2 individuos cada una), y microorganismos no patógenos, tales como: *Phacus sp.* (19 individuos), *Westella botryoides* (24 individuos), *Haematococcus sp.* (25 individuos) y *Euglena sp.* (17 individuos). Un estudio llevado en Sudáfrica investigó la coexistencia de posibles bacterias patógenas humanas y amebas de vida libre en muestras recolectadas de agua almacenada en hogares rurales de Sudáfrica que utilizan agua de pozo como fuente primaria de agua. Durante un período de 5 meses, se recolectaron y evaluaron un total de 398 muestras de agua almacenada y 392 de biopelícula. Entre las especies identificadas se encontraron *Vermamoeba vermiformis*, *Entamoeba spp.*, *Stenamoeba spp.*, *Flamella spp.* y *Acanthamoeba spp.* Incluido el genotipo T4 de *Acanthamoeba*, que se sabe que es potencialmente peligroso para los humanos. Además, se identificaron bacterias patógenas potenciales tales como *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.* y otros patógenos oportunistas emergentes como *Stenotrophomonas maltophilia*. Los resultados mostraron la importancia de realizar más estudios para evaluar el riesgo para la salud de las amebas de vida libre y las posibles bacterias patógenas humanas para las personas que viven en comunidades rurales que no tienen otra opción que almacenar agua en sus hogares debido a la escasez de agua (Potgieter *et al.*, 2021).

Conflicto de intereses

No se reporta conflicto de intereses.

Agradecimientos

A todo el equipo de investigación.

Referencias

- Andrews, G. (2018). Resolving the water pollution crisis in the Philippines: the implications of water pollution on public health and the economy. *Pepperdine Policy Rev.* 10, 2. Disponible en: <https://digitalcommons.pepperdine.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1163&context=ppr> (Acceso mayo 2022).
- Australian drinking water guidelines 6 2011 national water quality management strategy. Disponible en: <https://www.nhmrc.gov.au/sites/default/files/documents/reports/aust-drinking-water-guidelines.pdf>. (Acceso mayo 2022).
- Balczun, C., & Scheid, P. L. (2017). Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses*, 9(4), 65. <https://doi.org/10.3390/v9040065>
- Botero D. En: Botero D, Restrepo M, editores Parasitosis humanas. Medellín, Colombia: Fondo Editorial CIB; 2003. Disponible en: https://www.academia.edu/39012985/PARASITOSIS_HUMANAS (Acceso mayo 2022)
- Buerano, C. C., Trinidad, A. D., Fajardo, L. S., Cua, I. Y., Baclig, M. O., & Natividad, F. F. (2014). Isolation of acanthamoeba genotype t4 from a non-contact lens wearer from the Philippines. *Tropical medicine and health*, 42(4), 145–147. <https://doi.org/10.2149/tmh.2014-15>
- Burak, D. M., & Zeybek, Z. (2011). Investigation of Legionella pneumophila and free living amoebas in the domestic hot water systems in İstanbul. *Turk J Biol* 35, 679-685. <https://doi.org/10.3906/biy-0907-93>

- Castrillón, J. C., & Orozco, L. P. (2013). *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista chilena de infectología*, 30(2), 147-155. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200005 (Acceso mayo 2022).
- Cope, J. R., Landa, J., Nethercut, H., Collier, S. A., Glaser, C., Moser, M., Puttagunta, R., Yoder, J. S., Ali, I. K., & Roy, S. L. (2019). The Epidemiology and Clinical Features of Balamuthia mandrillaris Disease in the United States, 1974-2016. *Clinical infectious diseases*, 68(11), 1815–1822. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy813>
- Duggal, S., Rongpharpi, S., Duggal, A., Kumar, A & Biswal I. (2017). Role of *Acanthamoeba* in granulomatous encephalitis: a review. *Journal of Infectious Diseases & Immune Therapies*, 1(1), 1000103. Disponible en: https://www.scitechnol.com/peer-review/role-of-acanthamoeba-in-granulomatous-encephalitis-a-review-JszK.php?article_id=7095 (Acceso mayo 2022).
- Fabros, M. R. L., Diesta, X. R. S., Oronan, J. A., Verdejo, K. S., Garcia, J. S. M., Sophia Romey, M., & Milanez, G. J. (2021). Current report on the prevalence of free-living amoebae (FLA) in natural hot springs: a systematic review. *Journal of water and health*, 19(4), 563–574. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.101>
- Gabriel, S., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2019). Occurrence of free-living amoebae (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*) in water samples in Peninsular Malaysia. *Journal of water and health*, 17(1), 160–171. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.164>
- Grace, E., Asbill, S., & Virga, K. (2015). *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6677–6681. <https://doi.org/10.1128/AAC.01293-15>
- Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J. R., Frazer, D. G., & Matheson, M. (2004). *Acanthamoeba keratitis*: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(1), 165–169. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0559>
- Kofman, A., & Guarner, J. (2022). Infections Caused by Free-Living Amoebae. *Journal of clinical microbiology*, 60(1), e0022821. <https://doi.org/10.1128/JCM.00228-21>
- Lee, D. I., Park, S. H., Baek, J. H., Yoon, J. W., Jin, S. I., Han, K. E., & Yu, H. S. (2020). Identification of Free-Living Amoebas in Tap Water of Buildings with Storage Tanks in Korea. *The Korean journal of parasitology*, 58(2), 191–194. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.191>
- Marciano-Cabral, F., Jamerson, M., & Kaneshiro, E. S. (2010). Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of water and health*, 8(1), 71–82. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.129>
- Martinez, A. J. (1985) *Free-Living Amoebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease*. Boca Raton, USA. CRC Press. Disponible en: <https://www.routledge.com/Free-Living-Amebas-Natural-History-Prevention-Diagnosis-Pathology-and/Martinez/p/book/9781315893044> (Acceso mayo 2022).
- Matias, R. R., Enriquez, G. L., & Natividad, F. F. (1991) Cell biology of the Philippine amoeboflagellate, *Naegleria philippinensis*. *Trans Nat Acad Sci Tech.*, 13, 439–444. Disponible en: <https://www.herdin.ph/index.php/component/herdin/?view=research&cid=34748> (Acceso abril 2022).
- Milanez, G. D., Masangkay, F. R., Martin I, G. L., Hapan, M. F. Z., Manahan, E. P., Castillo, J., & Karanis, P. (2022). Epidemiology of free-living amoebae in the Philippines: a review and update. *Pathogens and global health*, 116(6), 331–340. <https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2035626>
- Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Cárcamo, C., & Gottlieb, B. (2003). Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitología latinoamericana*, 58(3-4), 106-111. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122003000300003>
- National Research Council. *Drinking Water and Health, Volume 4*. Washington DC, USA. The National Academies Press. 1982. <https://doi.org/10.17226/325>
- Park, M. K., Cho, M. K., Kang, S. A., Park, H. K., Kim, D. H., & Yu, H. S. (2014). *Acanthamoeba* protease activity promotes allergic airway inflammation via protease-activated receptor 2. *PloS one*, 9(3), e92726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092726>
- Potgieter, N., van der Loo, C., & Barnard, T. G. (2021). Co-Existence of Free-Living Amoebae and Potential Human Pathogenic Bacteria Isolated from Rural Household Water Storage Containers. *Biology*, 10(12), 1228. <https://doi.org/10.3390/biology10121228>

- Scheid, P. (2018). Free-living amoebae as human parasites and hosts for pathogenic microorganisms. *Proceedings*, 2(11), 692. <https://doi.org/10.3390/proceedings2110692>
- Schuster, F. L. (2002). Cultivo de amebas de vida libre patógenas y oportunistas. *Revisiones de microbiología clínica*, 15(3), 342–354. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.342-354.2002>
- 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, 1001-1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>
- Semenza, J. C. (2020). Cascading risks of waterborne diseases from climate change. *Nature immunology*, 21(5), 484–487. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0631-7>
- Sousa-Ramos, D., Reyes-Batlle, M., Bellini, N. K., Rodríguez-Expósito, R., Martín-Real, C., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2022). Pathogenic free-living amoebae from water sources in Cape Verde. *Parasitology Research*, 121, 2399–2404. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07563-y>
- Vaerewijck, M. J, Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K., & Houf, K. (2014). Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: potential consequences for food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 924–944. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12100>
- 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, 1–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>