

Alternativa rápida de extracción de ADN en quistes de *Acanthamoeba* para uso en el laboratorio de análisis clínicos

► María del Carmen Rojas^{1a*}, Pablo Mauricio Vázquez^{2a}, Sixto Raúl Costamagna^{3b}

¹ Lic. en Cs Biológicas, Doctora en Biología. <https://orcid.org/0000-0002-3623-1156>.

² Ing. Agrónomo, MSc. Producción Vegetal. <https://orcid.org/0000-0002-9405-766X>.

³ Bioquímico, Máster internacional en enfermedades parasitarias tropicales, Doctor en Bioquímica. <https://orcid.org/0000-0001-8358-6155>.

^a Estación Experimental Agropecuaria Guillermo Covas, INTA-Anguil. RN. 5 Km 580. CP 6326, Anguil, La Pampa, Argentina.

^b Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

El objetivo del estudio fue comparar la extracción de ADN de quistes de *Acanthamoeba* sp. con un método disponible comercialmente y cuatro no comerciales utilizando tratamiento térmico y ultrasonido para la amplificación por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, reduciendo tiempos de preparación y extracción de las muestras, como una herramienta para el diagnóstico en el laboratorio clínico. Se utilizó una cepa de *Acanthamoeba*, genotipo T4, cultivada en agar no nutritivo. Los quistes para analizar, en tres períodos de enquistamiento, se almacenaron a temperatura ambiente. Se extrajo ADN mediante cinco métodos: pretratamiento térmico, ultrasonido y combinaciones de ellos. La PCR se llevó a cabo utilizando cebadores específicos JDP1/JDP2. La concentración y pureza del ADN extraído con los protocolos evaluados revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). El método E (comercial), el A (térmico) y el B (ultrasonido) lograron los mejores rendimientos en la amplificación del fragmento específico de *Acanthamoeba* sp. por la PCR convencional.

Palabras clave: Quiste; ADN; *Acanthamoeba*; Tratamiento térmico; Ultrasonido; Reacción en cadena de la polimerasa

Rapid DNA extraction alternative in cysts of Acanthamoeba for use in clinical analysis laboratory

Abstract

The objective of the study was to compare the DNA extraction of *Acanthamoeba* sp. cysts with a commercially available method and four non-commercial ones, with heat and ultrasound treatment that allows amplification by conventional polymerase chain reaction (PCR), reducing sample preparation and extraction times, such as a tool for diagnosis in the clinical laboratory. To this aim, a strain of *Acanthamoeba* T4 grown on non-nutrient agar was used. Plates with cysts at three different encystation times were stored at room temperature until the study was carried out. DNA was extracted with five methods that included pretreatments (thermal and ultrasound) or combinations of them. PCR was performed

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

using specific primers JDP1/JDP2. Concentration and purity of DNA revealed statistically significant differences ($p < 0.0001$) between methods. Method E (commercial), method A (thermal) and B (ultrasound) got the best yields in amplifying the specific fragment of *Acanthamoeba* sp. by conventional PCR.

Keywords: Cyst; DNA; *Acanthamoeba*; Heat treatment; Ultrasound; PCR

Alternativa rápida de extracción de DNA em cistos de *Acanthamoeba* para uso no laboratório de análises clínicas

Resumo

O objetivo do estudo foi comparar a extração de DNA de cistos de *Acanthamoeba* sp. com um método comercialmente disponível e quatro não comerciais utilizando tratamento térmico e ultrassom para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, reduzindo os tempos de preparo e extração das amostras, como ferramenta para o diagnóstico no laboratório clínico. Foi utilizada uma cepa de *Acanthamoeba*, genótipo T4, cultivada em ágar não nutritivo. Os cistos para analisar foram armazenados em temperatura ambiente, correspondendo a três períodos de encistamento. O DNA foi extraído por cinco métodos: pré-tratamento térmico, ultrassom e combinações deles. A PCR foi realizada usando iniciadores específicos JDP1/JDP2. A concentração e a pureza do DNA extraído com os protocolos avaliados revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Os métodos E (comercial), A (térmico) e B (ultrassom) alcançaram os melhores rendimentos na amplificação do fragmento específico de *Acanthamoeba* sp. por PCR convencional.

Palavras-chave: Cisto; DNA; *Acanthamoeba*; Tratamento térmico; Ultrassom; PCR

Introducción

Los protozoos del género *Acanthamoeba* son organismos de vida libre de amplia distribución ambiental (1) (2). Bajo determinadas circunstancias pueden comportarse como parásitos del hombre y otros animales (3) (4). Entre las patologías más notificadas se encuentran la encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y la queratitis acanthamoebiana (QA), aunque también pueden producir lesiones cutáneas, infecciones de senos paranasales y neumonía (5) (6) (7) (8) (9) (10). *Acanthamoeba* presenta un ciclo de alternancia entre trofozoíto y quiste, aunque estudios recientes sugieren estadios intermedios de acuerdo con el grado de enquistamiento (11). El trofozoíto es la parte activa y de división celular. El quiste es la estructura latente y de resistencia (12). Esta última estructura presenta una doble pared separada por un espacio. Este espacio que separa las capas se extiende por toda la superficie, excepto donde se forman los ostiolos (poros) que sirven para monitorear las condiciones ambientales (13). Ambas paredes presentan celulosa, en diferentes proporciones, acompañada por proteínas o una matriz granular (14) (15). La doble pared es responsable de la resistencia natural que presentan los quistes a la desecación, a los agentes químicos y físicos (16) (17). La resistencia natural del quiste se ve afectada por el medio seleccionado para cultivar los trofozoítos y también por el protocolo seleccionado para producir quistes (18) (19) (20). El cultivo

por periodos prolongados en medio axénico influye en la capacidad de enquistamiento de *Acanthamoeba* spp. (21). Tanto el protocolo que se utiliza para cultivar los trofozoítos como el usado para producir quistes pueden modificar la susceptibilidad de éstos (18). Independientemente del protocolo seleccionado, la cantidad de ADN del quiste permanece inalterada (22). Un diagnóstico correcto requiere de una adecuada toma de muestra que permita la recuperación de una cantidad considerable de trofozoítos o quistes. A su vez, se requiere un tiempo de entre 3 a 7 días para el desarrollo del cultivo, lo que retrasa así el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado. La detección del género *Acanthamoeba* por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) proporcionó métodos rápidos y sensibles, considerando los trofozoítos y los quistes (23) (24) (25). Estos resultados suelen estar condicionados por una insuficiente cantidad de material muestreado y por la resistencia natural de la forma quística. Para la lisis del quiste se han utilizado procedimientos basados en lisis química o mecánica con choque térmico (24) (26) (27) (28). Para la extracción de ADN de quistes se han utilizado diversos reactivos (amoníaco, proteinasa K y Chelex 100), con requerimiento de tiempos de incubación más prolongados, lo que generaba un retraso en el diagnóstico (24) (29) (30). También, para aumentar los rendimientos, se desarrollaron otras técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros cebadores específicos (23) (27). El sonicado se ha

utilizado como una estrategia de desinfección o limpieza para lentes de contacto (31). Esta metodología también está ampliamente extendida en la creación de bibliotecas para secuenciación de la próxima generación (NGS, del inglés: *next-generation sequencing*), pero es muy poco utilizada para extraer ADN de forma rutinaria para llevar a cabo una PCR de punto final. La aplicación del ultrasonido es un método con el que se puede aumentar la calidad y el rendimiento, con reducción de tiempo y costo de extracción. El objetivo de este trabajo fue comparar un método comercial con otras cuatro alternativas. Para ello se utilizó tratamiento térmico y de ultrasonido, solos o combinados, para extraer ADN de quistes de *Acanthamoeba*, lo que permitió la amplificación por una PCR convencional, pero reduciendo los tiempos de preparación y extracción de las muestras, haciendo que estas técnicas puedan ser aplicables al diagnóstico en el laboratorio de análisis clínicos.

Materiales y Métodos

Muestras de *Acanthamoeba*

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando una cepa de *Acanthamoeba* genotipo T4, secuenciada por los autores de este trabajo y proveniente de un caso de encefalitis amebiana granulomatosa en una paciente pediátrica (32). Los trofozoítos se cultivaron en placas de Petri (50 mm de diámetro y 14,2 mm de altura) con agar no nutritivo (ANN) cubierto con 500 µL de una suspensión de *Escherichia coli* en medio Page como nutriente para el protozoo. El crecimiento se evaluó mediante el examen microscópico directo. Las placas se incubaron a 37 °C y se monitorearon diariamente durante 15 días para la detección de trofozoítos. Finalizada la etapa de crecimiento, las placas con quistes se dejaron secar durante 7 días en estufa a 37 °C. Las placas, con la presencia de los protozoos ya enquistados, se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento del estudio. Se trabajó con tres tiempos diferentes de cultivo o enquistamiento: octubre de 2017, agosto de 2019 y enero de 2020.

Recolección de quistes de placas con agar no nutritivo deshidratado

Las placas con los protozoos enquistados fueron humedecidas con 1000 µL de agua de calidad molecular (libre de nucleasas, Biodynamics); se dejó hidratar el agar y luego se procedió a raspar suavemente con ansa. El líquido fue recolectado y se volvió a volcar en la placa, con el fin de arrastrar una mayor cantidad de quistes y obtener una mayor concentración; este procedimiento se repitió varias veces y para cada uno de los años estudiados.

Concentración de los quistes

Todos los quistes obtenidos, separados por año, se colocaron en tubos cónicos con 10 mL de agua de calidad molecular (libre de nucleasas Biodynamics). Las muestras fueron homogeneizadas invirtiendo cada frasco 15 veces. Se transfirieron 100 µL de cada una y 100 µL de una solución de Trypan Blue (0,4%, Sigma) a un tubo estéril de 1,5 mL para estimar la concentración y el porcentaje de quistes viables a través del recuento en cámara de Neubauer para cada año de estudio. Se analizaron 75 muestras con quistes (solución con proporciones iguales de los tres años estudiados) de *Acanthamoeba*, con una carga promedio de $1,35 \times 10^5$ quistes/mL.

Extracción de ADN

El ADN de los quistes fue extraído usando 5 métodos de extracción, como se puede observar en la Tabla I. Cada método tenía un pretratamiento o una combinación de estos métodos.

Las muestras de ADN extraídas fueron almacenadas y conservadas a -20 °C hasta su análisis.

Cuantificación y pureza del ADN

La cuantificación del ADN fue determinada por espectrofotometría (DeNovix DS11-Spectrophotometer) calculada a través de la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se obtuvo mediante la relación A260/A280 y A260/A230.

Amplificación por PCR convencional

La PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores específicos JDP1/JDP2 (33). La mezcla de reacción se realizó con 2,5 µL de *buffer* (Promega), 0,5 µL de una mezcla de DNTP (10 mM de cada uno) (Promega), 1,5 µL (20 µM) de cada cebador, 1,25 U Taq (Promega) y 5,0 µL de ADN. Se llevó a 25 µL de volumen final con agua libre de nucleasas (Biodynamics). Para el desarrollo de la PCR se utilizó un termociclador Ivema T18. Las condiciones de reacción fueron: 95 °C por 7 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa (Biodynamics) al 1,5%, teñidos con 5 µL de GelRed® (Biotium) y se visualizaron bajo luz UV con un transiluminador *Light Dual* (Labnet). El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con una escala de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos, Argentina). Como control positivo se utilizó ADN de una cepa de *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461.

Tabla I. Métodos de extracción de ADN de quistes de *Acanthamoeba* spp.

Método	Descripción	Detalle
A	Pretratamiento térmico	Las suspensiones de quistes (300 µL) se calentaron en baño María durante 10 min a 100 °C y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
B	Pretratamiento con ultrasonido	Las suspensiones fueron sonicadas a 20 kHz con un soporte en frío (sonicador <i>SONIC Vibra Cell</i> , modelo CV 18, Newton, EE.UU.) durante 10 s a una potencia de 80%, con intervalos de descanso de 5 s, completando un total de 30 s.
C	Pretratamiento térmico. Extracción artesanal: UNSET (34)	Como se describe en el método A. Adicionando extracción artesanal. Las muestras se lisaron con 500 µL de <i>buffer</i> de lisis UNSET (Urea-NaCl-SDS-EDTA-Tris ClH) a temperatura ambiente con igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugaron a 8000 g durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo, se trató con 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se precipitó el ADN con 10 µL de NaCl 3 M y 1 mL de etanol absoluto (frío) y se mezcló suavemente. Se mantuvieron a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugaron a 15 000 g durante 30 min. Los sedimentos se lavaron con 500 µL de etanol al 70% (frío) y se centrifugaron a 15 000 g por 30 min. Los sedimentos se secaron en un bloque térmico a 55 °C y se añadieron 100 µL de agua libre de nucleasas (Biodynamics).
D	Pretratamiento térmico + ultrasonido Extracción artesanal: UNSET (34)	Como se describe en el método A, posteriormente las suspensiones fueron sonicadas como se describe en el método B. La extracción se realizó como figura en el método C.
E	Pretratamiento ninguno Extracción comercial	Se utilizó un <i>kit</i> de extracción de ADN comercial (<i>Quick Tissue/Culture Cells Genomic DNA extraction</i> , Dongsheng Biotech, Montebio, China) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Las determinaciones de la cantidad y calidad del ADN obtenido con los diferentes métodos de extracción fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparadas mediante el *test* de Tukey (IC=95%, $\alpha=0,05$).

Se compararon las amplificaciones por PCR obtenidas a partir de los métodos de extracción de ADN mediante un *test* de *Chi* cuadrado ($\alpha=0,05$).

Resultados

Los valores de la concentración promedio de ADN (ng/µL), pureza y calidad (A260/280 y A260/230) obtenidos de las muestras y determinados mediante espectrofotómetro se muestran en la Tabla II.

La concentración y la pureza del ADN extraído mediante los protocolos evaluados revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) (Tabla II). El método C permitió obtener la mayor concentración. Con respecto a la relación A260/280 y A260/230 también se encontraron diferencias significativas entre los métodos, pero solo en los métodos C y D se obtuvieron valores de pureza óptima para las relaciones de absorbancia. La variable de interés fue el éxito en la amplificación para evaluar el rendimiento de los métodos. Se logró la amplificación por PCR convencional en el 52%

(39/75) de las muestras estudiadas. El método C, con el que se obtuvo la mayor concentración de ADN y una pureza óptima, no logró amplificar ningún fragmento específico (Tabla III).

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que amplificaron el segmento específico (*Chi* cuadrado=6,08; $p=0,10$).

Discusión y Conclusiones

En este estudio se logró extraer ADN utilizando métodos térmicos y de ultrasonido que permitieron la amplificación del fragmento específico de *Acanthamoeba* por PCR convencional. También se logró cumplir el objetivo con el método comercial y con el artesanal, si bien con este último se redujo el rendimiento. Para la extracción de ADN de quistes se han utilizado diversos procedimientos con muy buenos rendimientos (24) (26) (27) (28) (29) (30) debido a que la estructura del quiste genera una alta resistencia. El protocolo ideal de lisis debería tener la fuerza necesaria para romper el mismo y preservar la molécula de ADN para la amplificación, procedimiento que se logró utilizando el método A (térmico) y el B (ultrasonido). Cabe señalar que no se recomienda el uso del ultrasonido durante tiempos prolongados para evitar el calentamiento y la degradación del material celular (35). Para el diagnóstico clínico se requieren protocolos que sean sencillos,

Tabla II. Resumen estadístico de los valores mínimos, máximos, media y desvíos estándar expresados por método para la concentración de ADN y la pureza promedio obtenida.

	Método	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Concentración del ADN (ng/μL)	A	0,4	109,1	17,2	33,9
	B	0,4	119,7	18,9	35,6
	C	1,2	9954,5	4223,2	3327,0
	D	70,5	3823,7	919,6	1090,1
	E	0,9	69,1	10,2	18,5
A260/280	A	0,67	1,73	1,2	0,3
	B	0,26	1,26	0,8	0,3
	C	0,52	2,35	2,0	0,4
	D	1,52	2,05	1,8	0,2
	E	0,72	1,9	1,1	0,3
A260/230	A	0,35	1,45	0,7	0,3
	B	0,34	2,75	0,8	0,7
	C	1,65	2,15	2,0	0,2
	D	1,72	2,13	1,9	0,1
	E	0,31	1,97	0,9	0,4

Tabla III. Porcentaje de amplificación de ADN por PCR a partir de los métodos de extracción de ADN utilizados para todas las muestras analizadas (n=75).

Tratamiento	Método	PCR		% (+)
		Positiva	Negativa	
Térmico	Ninguno (A)	10	5	66,7
Ultrasonido	Ninguno (B)	11	4	73,3
Térmico	Artesanal (C)	0	15	0
Térmico + ultrasonido	Artesanal (D)	6	9	40,0
Ninguno	Comercial (E)	12	3	80,0

rápidos, reproducibles y económicos. En este trabajo se observó que los cinco métodos analizados fueron útiles para extraer ADN de *Acanthamoeba*, aunque no todos lograron la amplificación de los fragmentos específicos. En ningún método de extracción se registraron valores que indicaran contaminación por ARN.

El método comercial (E) logró generar fragmentos de ADN molde para ser amplificados por la PCR. Asimismo, este método no requirió de incubaciones previas, con lo que se disminuyeron aún más los tiempos de diagnóstico (24). Ni el método térmico (A) ni el ultrasónico (B) lograron ser tan eficaces como el método comercial (E).

Aunque los métodos térmico y físico no lograron ser tan eficaces como el comercial, ambas metodologías desarrolladas (por calentamiento y ultrasonido) simplificaron la preparación de la muestra y redujeron

los costos. Utilizar solo la opción térmica o el sonido permitió extraer ADN para amplificar el fragmento específico (421-500 pb). Ambas opciones se presentan como técnicas de extracción ideales debido a que poseen un número limitado de pasos, no utilizan disolventes peligrosos, son relativamente económicas y requieren poco tiempo (10 minutos o 30 segundos por muestra). Se considera que los resultados son importantes debido a que evidencian la posibilidad de extraer ADN de la fase quística acelerando los tiempos de diagnóstico clínico. Por todo lo expuesto se concluye que la extracción de ADN a partir de un pretratamiento térmico o por ultrasonido en quistes es un método sensible y confiable para la amplificación de ADN de *Acanthamoeba* por PCR convencional y representa una alternativa rápida y económica para el diagnóstico molecular. Disponer de un sonicador en laboratorios

que utilizan PCR es, en la actualidad, alta y accesible. Los mismos han ido logrando más espacio en los laboratorios de diagnósticos, las prestaciones son muy amplias, los costos no son altos y sirven para muchos tipos de muestras. El uso de reactivos tóxicos no son los deseables, pero son otra alternativa más económica.

Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. MARÍA DEL CARMEN ROJAS
EEA Guillermo Covas, INTA-Anguil.
RN. 5 Km 580. CP 6326, ANGUIL, La Pampa, Argentina.
Correo electrónico: rojas.maria@inta.gob.ar

Referencias bibliográficas

- Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitol Res* 2014; 113 (9): 3151-8.
- Rojas MDC, Rodríguez Fermepín M, Gracia Martínez F, Costamagna SR. Presencia de *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017; 49 (3): 227-34.
- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34 (9): 1001-27.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50 (1): 1-26.
- Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Luján H, *et al.* Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2010; 42 (2): 122-5.
- Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23 (6): 590-4.
- Brondfield MN, Reid MJ, Rutishauser RL, Cope JR, Tang J, Ritter JM, *et al.* Disseminated *Acanthamoeba* infection in a heart transplant recipient treated successfully with a miltefosine-containing regimen: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2017; 19 (2): 10.
- Casero RD, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teheranc A, *et al.* Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol* 2017; 54: 170-5.
- Rodríguez-Pérez EG, Escandón-Vargas K, Ancer A. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* sp. in an immunocompetent Mexican adult. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; 50 (3): 432.
- Sharma S, Srinivasan M, George C. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch Ophthalmol* 1990; 108 (5): 676-8.
- Chávez-Munguía B, Salazar-Villatoro L, Lagunes-Guillén A, Omaña-Molina M, Espinosa Cantellano M, Martínez-Palomero A. *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol Res* 2013; 112 (3): 1125-30.
- Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 2012 Jan 10; 5: 6.
- Gertiser ML, Visciarelli E, Costamagna SR. Ultraestructura de *Acanthamoeba* sp. (Amebozoa, Acanthamoebidae). *Rev Argent Parasitol* 2013; 1 (3): 28-39.
- Hirukawa Y, Nakato H, Izumi S, Tsuruhara T, Tomino S. Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim Biophys Acta* 1998 May 29; 1398 (1): 47-56.
- Garajová M, Mrva M, Vaškovicová N, Martinka M, Melicherová J, Valigurová A. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Sci Rep* 2019 Mar 14; 9 (1): 4466.
- Aksozek A, McClellan K, Howar K, Niedrekorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. *J Parasitol* 2000; 88 (3): 621-3.
- Turner NA, Russell AD, Furr JR, Lloyd D. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 (1): 27-34.
- Coulon C, Dechamps N, Meylheuc T, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. The effect of *in vitro* growth conditions on the resistance of *Acanthamoeba* cysts. *J Eukaryot Microbiol* 2012; 59 (3): 198-205.
- Aqeel Y, Siddiqui R, Iftikhar H, Khan NA. The effect of different environmental conditions on the encystations of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Exp Parasitol* 2013; 135 (1): 30-5.
- Pérez-Cota F, Smith RJ, Elsheikha HM, Clark M. New insights into the mechanical properties of *Acanthamoeba castellanii* cysts as revealed by phonon microscopy. *Biomed Opt Express* 2019; 10 (5): 2399-408.
- Köhler M, Leitsch D, Fürnkranz U, Duchêne M, Aspöck H, Walochnik J. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol Res* 2008; 102 (5): 1069-72.
- Bínová E, Bína D, Nohýnková E. DNA content in *Acanthamoeba* during two stress defense reactions: encystation, pseudocyst formation and cell cycle. *Eur J Protistol* 2021; 77: 125745.
- Rivière D, Szczebara FM, Berjeaud JM, Frère J, Héchard Y. Development of a real-time PCR assay for quantifica-

- tion of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *J Microbiol Methods* 2006; 64 (1): 78-83.
24. Goldschmidt P, Degorge S, Saint-Jean C, Yera H, Zekhnini F, Batellier L, *et al.* Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. *Br J Ophthalmol* 2008; 92 (1): 112-5.
 25. Laummaunwai P, Ruangjirachuporn W, Boonmars T. A simple PCR condition for detection of a single cyst of *Acanthamoeba* species. *Parasitol Res* 2012; 110 (4): 1569-72.
 26. Zamfir O, Yera H, Bourcier T, Batellier L, Dupouy-Camet J, Tourte-Schaeffer C, *et al.* Diagnostic par PCR des kératites à *Acanthamoeba* spp. [Diagnosis of *Acanthamoeba* spp. keratitis with PCR]. *J Fr Ophtalmol* 2006; 29 (9): 1034-40.
 27. Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (10): 3232-6.
 28. Boggild AK, Martin DS, Lee TY, Yu B, Low DE. Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1314-8.
 29. Iovieno A, Miller D, Lonnen J, Kilvington S, Alfonso EC. Extraction of *Acanthamoeba* DNA by use of Chelex resin. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (1): 476-7.
 30. Maubon D, Dubosson M, Chiquet C, Yera H, Brenier-Pinchart MP, Cornet M, *et al.* A one-step multiplex PCR for *Acanthamoeba* keratitis diagnosis and quality samples control. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 14: 53 (6): 2866-72.
 31. Hay J, Seal DV, Connor R, Simmons PA, Tomlinson A. Disinfection and sonication: effect on association of *Acanthamoeba* cysts with an ionic, high-water content contact lens. *J Br Contact Lens Assoc* 1995; 18 (1): 5-8.
 32. Tello Brogiolo N, Molina N, Esposto S, Magistrello P, Bustamante J, D'Agustini M. Encefalitis amebiana granulomatosa por amebas de vida libre en un paciente pediátrico. *Rev Argent Neurocir (Supl. Pediatría)* 2020; 1 (1): S47-51.
 33. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, *et al.* Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (5): 1903-11.
 34. Hugo ER, Stewart VJ, Gast RJ, Byers TJ. Purification of amoeba mtDNA using the UNSET procedure. En: Lee JJ, Soldo AT, editors. *Protocols in protozoology*. Allen Press, Lawrence, Kansas 1992, 7.1.
 35. Brown R, Audet J. Current techniques for single-cell lysis. *R Soc Interface* 2008 Oct 6; 5 (Suppl 2): S131-8.

Recibido: 15 de noviembre de 2021

Aceptado: 11 de marzo de 2022