
LAS AMEBAS ANFIZOICAS DEL HOMBRE

DIMAS FERNÁNDEZ-GALIANO

Académico de Número.

Discurso leído en la solemne sesión
inaugural del curso 1979 de la Real
Academia Nacional de Medicina de
Madrid, el día 16 de enero de 1979.

De acuerdo con su etimología¹, las amebas son unos organismos de forma cambiante, que pueden ofrecer unos aspectos morfológicos muy distintos a lo largo de su ciclo biológico, aspectos que dependen frecuentemente de las condiciones físico-químicas del ambiente en que se desarrollan. Este continuo deformarse, perder la forma, es un obstáculo prácticamente insalvable cuando se trata de la determinación específica -y aun genérica- de las amebas y genera una gran inseguridad entre los protozoólogos que se dedican especialmente al estudio de este importante grupo de organismos.

¹El vocablo ameba deriva de la palabra griega *amoibg* que significa cambio.

No es, pues, de extrañar que el gran protozoólogo francés Edouard Chatton introdujera en una obra póstuma, publicada en 1953, el concepto de "tipo fisonómico" de ameba, concepto verdaderamente notable a la hora de clasificar las amebas, ya que está, al parecer, muy lejos de los rigurosos criterios científicos que deben presidir la clasificación de los organismos y demasiado cerca de la apreciación subjetiva que, como dice Grassé, es "le plus mauvais des critères scientifiques".

A pesar de ello, y no en vano Chatton era un experto conocedor de los protozoos, el criterio se ha revelado útil, por lo menos para una primera aproximación al problema del conocimiento de las amebas e incluso hoy el tipo fisonómico tiene un valor taxonómico, siendo lícito, por ejemplo, hablar en términos generales de las entamebas o de las amebas del tipo limax.

El conocimiento de uno de los tipos fisonómicos más complicados desde el punto de vista taxonómico, precisamente uno de los que acabo de citar, el de las amebas de tipo limax, era hasta hace pocos años una "academic matter" que parecía no interesar más que a los especialistas más estrictos y solo desde el punto de vista descriptivo. De un tiempo a esta parte, sin embargo, el grupo de las pequeñas amebas limax ha saltado a la actualidad parasitológica al descubrirse que alguno de sus representantes son organismos parásitos y patógenos del hombre y de los animales.

La propia delimitación del grupo de las amebas limax, dado que el mismo carece de un "status" sistemático definido, adolece de una notoria imprecisión. Recientemente (1974b) y recogiendo sus propias ideas expresadas en un trabajo de 1967, uno de los más notables especialistas en este tipo de animales, Page, lo define y delimita describiéndolo como un grupo que comprende las amebas cuya forma locomotriz es monopódica, cilíndrica o subcilíndrica y en la cual la zona hialina anterior (si existe) no está más aplanada que la mesa granular posterior, es decir, posee un extremo anterior más o menos hemisférico. No todos los protozoólogos coinciden con Page en este criterio, que él mismo califica de "narrow"; para la mayoría de los autores pertenecen también al tipo limax aquellas amebas cuyo amplio pseudópodo anterior es más o menos aplanado y no se trata aquí de un mero detalle de interés morfológico, sino de una interesante precisión taxonómica, pues de aceptarse la definición de Page quedaría excluido del grupo de las amebas limax una especie tan importante desde el punto de vista que estamos considerando como el género *Acanthamoeba*, ameba que se caracteriza en su forma locomotriz, además de por el carácter citado, por la posesión de unos pequeños y puntiagudos pseudópodos, a modo de espinas, denominados acantópodos.

Tanto si se toma en el sentido restringido de Page o en el más amplio que los protozoólogos suelen adoptar, lo cierto es que hasta hace pocos años una de las características más generales del grupo de las amebas limax era el que se trataba de amebas pequeñas que habitan en el suelo y que se suelen presentar en las infusiones, es decir, que se trataba de organismos de vida libre.

A pesar de ellos, hay una serie de datos en la literatura que aparecen esporádicamente, sobre el descubrimiento de amebas limax en diversos seres humanos afectados de alguna dolencia, principalmente cuadros diarreicos o disintéricos. La primera vez que esto se observa es en 1899, año en que Schardinger descubre una ameba limax, a la que denomina *Amoeba gruberi*, (hoy *Naegleria gruberi*) en las heces de un enfermo diagnosticado de disentería. De vez en cuando, a finales del siglo pasado y principios del actual, aparecen trabajos en que se da cuenta de descubrimientos semejantes, siendo digno de destacarse el de Chatton y Lalung-Bonnaire en 1912, los cuales descubrieron una ameba limax en las heces de un paciente que, aunque en el momento de la recogida de las heces no presentaba los síntomas clásicos de la disentería amebiana, sufría desde hacía algunos años de una diarrea crónica intermitente; el trabajo de Chatton y Lalung-Bonnaire es verdaderamente digno de destacarse debido, en primer lugar, a la excelente labor experimental que llevaron a cabo cultivando el parásito y estudiando cuidadosamente su enquistamiento y los detalles de su división mitótica, y en segundo término a los interesantes comentarios críticos que en él se insertan sobre la identidad de las amebas de los cultivos, tanto las del tipo limax manejadas por ellos como las del tipo entameba cultivadas por otros autores.

Pero estos descubrimientos no tuvieron la necesaria trascendencia para que los investigadores siguieran ahondando en esta línea, en gran parte debido al trabajo de Wells de 1911, en el que se exponía la opinión de que en todos estos casos se trataba de amebas procedentes de quistes transportados por el aire a las heces o a los cultivos, es decir, de simples contaminaciones aéreas.

Hay que advertir que en la opinión de Wells pesó decisivamente la afirmación de Schaudinn (1903) de que la única especie de ameba patógena para el hombre es *Entamoeba histolytica*, y por cierto que no es ésta la única vez que las tajantes afirmaciones de Schaudinn, respaldadas por su inmensa autoridad, fueron un freno para la investigación protozoológica, como he comentado yo anteriormente (Fernández-Galiano, 1975) al hablar de su pretendida observación de la entrada de los esporozitos de *Plasmodium* en los hematíes humanos.

La segunda parte de esta historia comienza en 1957, cuando Jahnes, Fullmer y Li, que trabajaban con cultivos de tejido de riñón de mono con el fin de inocularlos con virus de la polio, observaron que en unas placas de lisis citopática que en principio atribuyeron a la acción del virus aparecía una ameba de tipo limax que ellos clasificaron como *Acanthamoeba*, aunque hoy hay que dudar de que esta atribución genérica fuera exacta.

Dos años más tarde, Culbertson y colaboradores (1959), que trabajaban también con los cultivos de tejidos en los que habían observado unos efectos citopáticos, inyectaron el líquido del cultivo en el cerebro de unos ratones y monos, con objeto de probar la virulencia de los presuntos virus causantes de dichos efectos citopáticos. En los animales de experimentación se produjo una meningoencefalitis mortal, en cuyas lesiones no apareció virus alguno, sino amebas de tipo limax, que determinaron como pertenecientes al género *Acanthamoeba* pero que Singh y Das (1970) clasificaron como una *Hartmannella*, creando para ella la nueva especie *H. culbertsoni*. Por cierto que la nueva especie fue admitida, pero hoy se cree de nuevo que el nombre genérico que conviene a esta ameba es el que asignó Culbertson, por lo que se la denomina *Acanthamoeba culbertsoni*.

Es posible que la producción de esta meningoencefalitis experimental en los animales de laboratorio no hubiera tenido gran trascendencia para la medicina si no hubiera sido porque poco tiempo después, en 1961, Wang y Feldman, inoculando con secreciones nasofaríngeas humanas diversos cultivos de tejidos, pudieron observar en ellos el desarrollo de *Acanthamoeba*, estableciendo así una primera relación entre la presencia de amebas limax en la nasofaringe humana y su posible poder patógeno.

Este poder patógeno, por supuesto, era ya sospechado por Culbertson, pero la primera descripción clínica de la enfermedad fue publicada en 1965 por Fowler y Carter quienes dieron cuenta de cuatro casos, el primero de los cuales había sido observado en 1961. En 1966, Butt designó esta enfermedad con el nombre de meningoencefalitis amebiana primitiva. El diagnóstico realizado al principio sobre preparaciones histológicas en las que aparecían las amebas, se hizo más tarde, cuando se detectaron más casos de esta enfermedad, aislando el parásito que no era, al parecer, la *Acanthamoeba* que se había creído al principio sino una *Naegleria* (Butt, Baro y Knorr, 1968) a la que más adelante Carter (1970) asignó el nombre de *N. fowleri*.

Desde entonces se han publicado numerosos casos de meningoencefalitis amebiana primitiva, todos ellos atribuidos a *Naegleria*, habiendo sido los primeros estudiados en Europa los de Cerva y colaboradores (1969) en Checoslovaquia, de Apley y colaboradores (1970) en Inglaterra y de Jadin y colaboradores (1971) en Bélgica.

Quiero detenerme un momento sobre este último descubrimiento por una razón de índole personal. En efecto, el doctor Jean Baptiste Jadin, con quien me une hace años una buena amistad, presentó (con su discípulo E. Willaert como coautor) la comunicación en la que dio a conocer tres casos de meningoencefalitis amebiana

primitiva diagnosticados por él en Anvers (Bélgica) en una de las sesiones de una de las reuniones de Groupement des Protistologues de Langue Française que me cupo el honor de organizar en Madrid en mayo de 1971. En esta comunicación, al igual que en los dos trabajos publicados posteriormente (y en los que figuraron, además de Jadin, otros coautores: Jadin y colaboradores, 1971; Jadin y Willaert, 1972a), se atribuía la meningoencefalitis a *Naegleria gruberi*. Se trataba, no obstante de *N. fowleri*, nombre que, para designar a la especie patógena había acuñado Carter el año anterior, como queda dicho.

La publicación de estos primeros casos de una meningoencefalitis debida a unas amebas limax despertó mucho interés, a consecuencia del cual se incrementó la búsqueda y la publicación de nueva información de primera mano y se publicaron entre 1971 y 1973 nada menos que cuatro revisiones sobre este tema, las de Culbertson (1971), Carter (1972), Duma (1972) y Jadin (1973), revisiones que tuvieron la virtud de contribuir a que el referido interés no haya decaído todavía.

Como se habrá comprendido ya, uno de los primeros problemas que se han planteado a los estudiosos de esta enfermedad humana tan recientemente descubierta, ha sido el de determinar la identidad cierta del agente patógeno.

En primer lugar, sucede que los diferentes zoólogos que están especializados en el estudio de las amebas no están de acuerdo sobre los criterios que se han de aplicar a la sistemática de las amebas limax ni, por consiguiente, sobre la sistemática misma.

En su excelente puesta a punto redactada en 1973, el ya mencionado doctor Jean Baptiste Jadin, uno de los que mejor conoce este tema, resumía las posiciones sostenidas por aquellas fechas sobre la clasificación de estos organismos. Una de ellas, que tiene su origen en la antigua clasificación de Alexeieff (1912), era mantenida a la sazón por Page (1967a, 1967b); la otra clasificación fue elaborada por Singh y Das en 1970.

El sistema de Singh divide el Orden Amoebida (las amebas desnudas) en dos Familias, basándose en la persistencia o la desaparición de la membrana nuclear en el transcurso de la mitosis: En la primera Familia, Schyzopyrenidae, se comprenden siete géneros, entre ellos *Naegleria*; la segunda Familia Hartmannellidae, se divide en cuatro géneros, entre los que figura *Hartmannella*. Atendiendo exclusivamente a las amebas limax, pues, como se acaba de decir, esta clasificación comprende a todas las amebas desnudas, hay que hacer constar que Singh no acepta la validez ni del género *Valhkampfia* ni del género *Acanthamoeba*, pues para él, el primero de ellos está incluido en el género *Tetramitus* y el segundo en *Hartmannella*.

En mi opinión, que coincide con la de la mayoría de los protozoólogos y aun con la de los clínicos que se interesan por estas cuestiones, se puede otorgar un mayor crédito a la clasificación de Page que a la de Singh. En efecto, dicho autor ha realizado un estudio muy cuidadoso sobre las amebas desnudas, especialmente sobre las del grupo limax, y se ha esforzado en hallar un equilibrio entre los que él mismo llama "el enfoque pseudopodial" y "el enfoque citológico" de la sistemática de las amebas (1967a), es decir, procurando no asignar una decisiva importancia a la naturaleza de los pseudópodos de las formas activas. En la primera Familia, Valhkampfidae, aparecen incluidas las amebas que se dividen por promitosis, que se reparten entre los géneros *Valhkampfia* y *Naegleria*. La segunda Familia, formada por amebas que al dividirse experimentan una mitosis más o menos típica, comprende los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba*.

Este sistema, tan sencillo, ha sido, como acabo de decir, muy bien acogido, pero ya desde 1967 el mismo Page se mostraba reticente en cuanto a la inclusión de *Acanthamoeba* en la Familia Hartmannellidae y opinaba que este género debía quedarse de momento en dicha Familia hasta que se obtuviera una mayor información sobre él (1967b). Definitivamente, el mismo autor, en 1974, afirma taxativamente que *Acanthamoeba* no tiene que incluirse en dicha Familia, opinión que, por supuesto, creo acertada. Todo esto nos puede servir para darnos una idea de hasta que punto persisten dudas y vacilaciones en cuanto a la determinación supragenérica de estas amebas y, en suma, en cuanto a su integración en un sistema que dista mucho de ser definitivo.

Ahora bien, en general, estas cuestiones son de un interés muy escaso para los médicos o los sanitarios que se han de enfrentar, como veremos, con problemas muy serios planteados por estas amebas, por lo que no vale la pena detenernos más en ellas. Pero más importancia tiene el hecho de que a nivel específico también son muy desacordes las opiniones o, por lo menos, los datos bibliográficos no demasiado recientes.

Como luego veremos, para la precisa determinación de estas amebas se precisan unos medios que no están al alcance de todos y a la falta de los cuales es muy difícil conocer la especie de la ameba con la que el investigador se enfrenta en cada caso. Esta dificultad se hace patente cuando se trata de la pareja de géneros *Hartmannella-Acanthamoeba*, que han sido confundidos con tanta frecuencia que uno de los mejores conocedores

del problema de las amebas limax patógenas, Culbertson, en su interesante revisión de 1971, prefiere referirse a las cepas aisladas del grupo H-A (*Harmannella-Acanthamoeba*), más bien que a los géneros y las especies mismas.

No obstante, en la actualidad y gracias a los métodos extraordinariamente esclarecedores que hoy se emplean para la precisa determinación específica de estas amebas, se puede afirmar que las amebas patógenas o presuntas patógenas para el hombre del grupo limax son las siguientes:

Género *Acanthamoeba*: Este género comprende amebas limax pequeñas, cuyas formas vegetativas miden generalmente entre 15 y 40 micras. Durante la locomoción la ameba exhibe un ancho pseudópodo anterior hialino, del cual salen varias proyecciones cortas, finas y hialinas, que semejan espinas, denominadas acantópodos, las cuales se comportan como pseudópodos que son, formándose y desapareciendo en el curso de la marcha de la ameba.

La formación de las vacuolas digestivas se realiza mediante la creación, generalmente en la parte posterior de la ameba, de unos cortos pseudópodos romos y curvos que rodean a la presa dando lugar a una cavidad redonda, denominada por algunos la "food cup".

El núcleo es vesicular, con un grueso cariosoma que desaparece en la mitosis, lo mismo que la membrana nuclear. En esta mitosis, en la que no hay centriolos, se forma un huso acromático que unas veces es afilado por sus extremos y otras romo, sin que converjan sus fibras.

Los quistes de *Acanthamoeba* son pequeños, de un diámetro medio, entre 10 y 12 micras. La pared del quiste es doble, con una membrana endoquística más o menos poliédrica, de contorno estrellado, y un exoquiste más redondeado, que suele ser rugoso. Una importante característica del quiste es su composición química. Ya en 1962, Tomlison y Jone aislaron un polisacárido insoluble del endoquiste que resultó ser celulosa, el polisacárido tan típicamente vegetal. Este descubrimiento fue comprobado por el mismo año por Neff y Benton (1962) y nuevamente estudiado por Neff y Benton y Neff (1978) algo después. Ultimamente, en este mismo año, Blanton y Villemez (1978) acaban de estudiar cuidadosamente la composición del referido polisacárido, comprobando que se trata de celulosa pura y determinando el peso molecular de sus cadenas. Y he dicho que este aspecto de la composición química del quiste es importante porque, aparte de la trascendencia bioquímica del hallazgo de este producto en una ameba, podría constituir una característica absolutamente diferencial entre los géneros *Acanthamoeba* y *Harmannella* y contribuir, por lo tanto, a deshacer en el futuro la confusión entre ambos géneros. En efecto, frente a estos datos indudablemente fidedignos que acreditan la presencia de celulosa en los quistes de *Acanthamoeba*, no hay noticias de un hecho igual en los quistes de las amebas del género *Harmannella*, excepción hecha de un dato contenido en un artículo de Weisman del año 1976, el cual elude allí a una comunicación personal que le ha hecho Upadhyay (pág. 209 del trabajo de Weisman) en la que este autor afirma que el quiste de *Hartmannella glebae* contiene un 65% de proteína y un 4% de celulosa, dato que, repito, no he vuelto a encontrar en la literatura al respecto.

Las especies del género *Acanthamoeba* se encuentran frecuentemente en el suelo húmedo y en el agua, siendo sumamente comunes. Las más conocidas son: *A. castellani* y *A. culbertsoni*.

Género *Hartmannella*: Comprende este género amibas limax diminutas, cuyas formas vegetativas suelen medir entre 10 y 35 micras y se parecen bastante a las del género *Acanthamoeba*, tanto en su aspecto y locomoción como en su núcleo, que ostenta un grueso cariosoma y se divide por una mitosis sin centriolo, parecida a la que sufren las amebas de este último género. Sin embargo, difieren de dichas amebas por la carencia de los acantópodos finos e hialinos y por la falta de una "food cup" en el caso de la formación de la vacuola digestiva.

Los quistes de *Hartmannella* son pequeños, de un diámetro aproximado entre 4 y 10 micras, lisos y con una pared quística dividida en exoquiste y endoquiste. En ellos existe un polisacárido, pero que no parece ser celulosa, pues no da las coloraciones típicas de este compuesto.

La especie más importante de este género es *H. vermiformis*.

Género *Naegleria*: En este género se comprenden unos protozoos que durante su ciclo biológico se pueden encontrar, además de enquistados como los otros géneros a los que nos acabamos de referir, en dos formas vegetativas: la de ameba limax y la de flagelado.

La forma ameba es pequeña, pues mide en movimiento entre 15 y 25 micras. Generalmente es alargada en el sentido de la marcha, aunque a veces su anchura puede igualar a su longitud. Suele ostentar un pseudópodo

anterior bien desarrollado, hialino, a veces bifurcado, y su parte posterior es con frecuencia puntiaguda, terminada en uno o varios pseudópodos muy finos, a los que se adhieren diversos restos y partículas. Las vacuolas digestivas son en esta ameba muy pequeñas, de tal modo que con frecuencia no se perciben fácilmente.

El núcleo es vesicular, con un grueso cariosoma y cuando se divide por mitosis no desaparecen durante el proceso ni la membrana nuclear ni el mencionado cariosoma, el cual se divide en dos "masas polares" que se integrarán en cada uno de los núcleos hijos: se trata, pues, de un proceso mitótico primitivo que Nägler en 1909 designó con el nombre de promitosis y que recientemente Pussard (1973) ha vuelto a definir.

Para las amebas que acabo de citar, al igual que para otras que se han encontrado en animales domésticos (vacas, perros, cerdos, conejos, palomas y pavos, según Kadlec, 1978) y no domésticos (serpientes, lagartijas, ostras) ha creado Page (1974b) el concepto de amebas anfitoicas.

Este autor contrapone esta denominación por un lado a un término clásico, la palabra endozoico, que aplicada a las amebas comprende todas aquéllas que cumplen su ciclo vegetativo entero en el interior de los seres vivos y solamente se hallan al exterior bajo la forma quística, como las consideradas de siempre amebas parásitas o endocomensales del tubo digestivo humano, como *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba bütschli*, etc.; por otra parte, el neologismo anfitoico se opone a la denominación que Page asigna a las amebas de vida libre, a las que llama exozoicas, comprendiéndose entre estas últimas, por supuesto, las amebas coprozoicas, las cuales pueden vivir y desarrollarse en los excrementos animales en el caso que éstos se conserven húmedos y sean contaminados por quistes amebianos transportados por el aire.

Pues bien, para Page, los protozoos anfitoicos (y entre ellos las amebas) son aquéllos que no sólo se encuentran en condiciones exozoicas y endozoicas, sino que son capaces de alimentarse y multiplicarse tanto en una como en otra condición. Y añade Page que la mayoría de las amebas comprendidas en este grupo son preferentemente de vida libre (exozoicas) y sólo pasan ocasionalmente al interior de seres vivos, por lo que les podría convenir la denominación de "amebas facultativamente endozoicas" si no fuese porque alguna de ellas, como *Entamoeba moshokovskii*, son exactamente lo contrario, es decir, "facultativamente exozoicas".

Llegados a este punto, interesa, por supuesto, sobre todo, el posible poder patógeno de las amebas anfitoicas de los géneros que hemos mencionado anteriormente como relacionadas con el hombre.

Aunque, dadas la incertidumbre y las vacilaciones que en lo relativo a la determinación sistemática de estas amebas se refiere han reinado y reinan todavía entre los científicos, no son muy seguros los datos que se poseen sobre la capacidad patógena o real de los tres géneros de amebas a los que acabo de referirme, parece que se puede descartar en principio al género *Hartmannella* como patógeno y aún es dudoso que se le pueda considerar como anfitoica en el sentido de Page. Efectivamente, todo parece indicar que las citas de estos últimos años que se refieren a especies de *Hartmannella* halladas en animales o en cultivos de tejidos han de ser atribuidas a especies del género *Acanthamoeba* y, más concretamente, a *A. culbertsoni*. Solamente una duda persiste si consideramos como válida la determinación realizada por Singh y Das (1972) como *Hartmannella rhysodes* de una ameba hallada en el sistema nervioso de un caso humano (que, por cierto, para mayor confusión, es designada como *Acanthamoeba rhysodes* por una serie de autores, como Page (1974a), Pussard y Pons (1977) y Willaert y colaboradores (1978).

En cambio, parece segura la capacidad patógena potencial para el hombre de *A. culbertsoni*. Principalmente esta especie y probablemente también otras del mismo género, como *A. castellani*, se ha hallado colonizando una gran variedad de ambientes y, aparte de su conocida existencia en el suelo y en el agua, ya desde hace bastantes años se han citado como contaminantes de cultivos de bacterias (Shin y Harley, 1936; Heweit, 1937) y de levaduras (Castelani, 1930). Ya antes he mencionado su descubrimiento como contaminante de cultivos de tejidos de mamíferos pero es preciso ahora insistir en los efectos citopáticos que produce en las células de estos cultivos. Estos efectos, ya observados por Chi y colaboradores en 1959, son tan aparentes y tan semejantes a los producidos por ciertos virus que en un principio se creyó que los cultivos de referencia estaban atacados por un virus, que incluso recibió la denominación de virus Ryan, equívoco deshecho por Armstrong y Pereira en 1969.

También conviene recordar las infecciones experimentales de ratones y monos por *A. culbertsoni* llevadas a cabo por Culbertson, a que antes me referí pero, además, hoy no se duda en atribuir una capacidad patógena desarrollada en condiciones naturales a las especies de *Acanthamoeba*. Según Stevens y colaboradores (1977), los casos humanos de meningoencefalitis amebiana primitiva estudiada en la década del 1960 al 1970 eran todos debidos a especies de *Naegleria*, pero posteriormente se han diagnosticado casos de infecciones cerebrales agudas o crónicas causadas indudablemente por *Acanthamoeba*, los cuales han sido publicados, entre otros, por Jager y Stamm en 1972, por Robert y Rorke en 1973, por Bhagwandeem y Carter en 1975 y por Willaert y Stevens

en 1976, así como también se han aislado varias *Acanthamoeba* de personas que padecían afecciones nasofaríngeas (Skocil y colaboradores, 1972) y oculares (Naginton y colaboradores, 1974; Visvesvara y colaboradores, 1975).

Por último, podemos preguntarnos si entre los casos indudables en que *Acanthamoeba* ha demostrado su capacidad patógena frente al hombre hay alguno en que la afección provocada por la referida ameba sea específicamente la meningoencefalitis amebiana primitiva. Jadin en 1973 opina que no; para él, en la etiología de esta enfermedad encontramos constantemente la ameba *Naegleria fowleri*. Sin embargo, dos años más tarde, dos investigadores muy concienzudos, Visvesvara y Balamuth (1975) afirman categóricamente que entre los casos publicados (que a la sazón eran ya más de setenta) hay por lo menos dos seguros (el de Jager y Stamm y el de Robert y Rorke, ambos ya mencionados) y dos probables en los que la meningoencefalitis amebiana primitiva fue debida a *Acanthamoeba*.

La capacidad patógena de por lo menos una especie del género *Naegleria* es mucho más indiscutible. Este género comprende solamente tres especies, *N. gruberi*, la especie más conocida, banal, del suelo y del agua, *N. fowleri*, la especie patógena, responsable de la mayoría, si no de todos, los casos de meningoencefalitis amebiana primitiva humana, y *N. jadini*, especie descubierta en 1973 por Willaert y Le Ray. Son precisamente estos dos autores los que, con ocasión de la descripción de la nueva especie, han puesto de manifiesto las diferencias morfológicas, antigénicas y de cultivo que diferencian entre sí estas tres especies, lo cual es de sumo interés por aportar criterios seguros para distinguir la patógena de las dos banales.

Uno de estos criterios es de un cierto valor, no solamente porque contribuye a la identificación de las especies de amebas a las que me estoy refiriendo, sino también porque se trata de un dato ecológico que puede tener cierta significación epidemiológica. En efecto, la especie banal *N. gruberi* no puede crecer en un medio axénico, necesitando para ello alimentarse de bacterias; en este caso, puede desarrollarse a 37° C. Esto puede interpretarse como que esta especie, aunque termotolerante, no se puede adaptar a un medio carente de su alimento habitual, lo que puede explicar su falta de patogenicidad. Por el contrario, las otras dos especies pueden vivir en un medio axénico, sin bacterias, pero solamente una de ellas, la patógena *Naegleria fowleri* puede crecer a 37° C, temperatura a la que no se desarrolla la banal *N. jadini*, siendo esta última circunstancia la que probablemente le impide un poder patógeno que exhibe la otra ameba. Como dice Willaert y Le Ray considerando estos hechos desde un punto de vista evolutivo, *N. jadini* parece representar una transición entre *N. gruberi*, ameba exclusivamente libre y *N. fowleri*, parásito facultativo (o, si se quiere, empleando la terminología de Page, organismo anfitriónico).

La meningoencefalitis amebiana primitiva es una enfermedad muy grave. La ameba entra generalmente en el cuerpo del hombre por las fosas nasales y es muy probable que primeramente colonice la cavidad nasal, en cuyo interior podría multiplicarse alimentándose de las abundantes secreciones y de los microorganismos que allí se alojan; después, la ameba invade el encéfalo por la vía del nervio olfatorio, desarrollándose en el cerebro y dando lugar a una sintomatología típica de meningoencefalitis, con cefaleas, vómitos y, posteriormente, una apnea que suele requerir intubación y que con frecuencia va seguida de la muerte del paciente en muy pocos días. En el líquido cefalorraquídeo se pueden observar unos elementos que no son otra cosa que las formas vegetativas de la ameba responsable de la enfermedad. La gravedad de esta última se debe, entre otras cosas, al hecho de que se trata de una enfermedad todavía mal conocida y poco frecuente, por lo que generalmente se tarda algún tiempo en establecer un diagnóstico acertado y en implantar un tratamiento adecuado, lo que, dada la rapidez de su evolución, conduce con frecuencia al fallecimiento del enfermo antes de haber podido luchar eficazmente contra el parásito.

Todavía hay mucho que investigar sobre el contagio de esta dolencia. Ciertamente, las amebas anfitriónicas son ubicuas y se hallan en la tierra y en el agua, y no es extraño que con frecuencia se hayan encontrado contaminando las fosas nasales, ya que se sabe que sus quistes están en del aire (Kingston y Warhurst, 1969)

Pero es dudoso que una infección producida por el polvo en las fosas nasales pueda pasar al cerebro y no existen datos que avalen esta posibilidad, probablemente porque la población de amebas que pueda desarrollarse en la nasofaringe a consecuencia de una contaminación aérea sea poco numerosa.

Se puede también insinuar, pero solamente como posibilidad, el que *Naegleria fowleri* pueda invadir el organismo humano a través de heridas, como aventuran muy recientemente Visvesvara y Healy (1978), que han encontrado la ameba en diversas vísceras.

Ahora bien, en la inmensa mayoría de los casos, la infección es debida a la invasión amebiana de la nasofaringe en contacto con aguas en las que *Naegleria fowleri* vive y se desarrolla como ameba de vida libre.

Sin duda, el agua es un medio ambiente excepcionalmente favorable para la vida de las amebas

anfizoicas, que se han hallado profusamente en colecciones acuáticas muy dispares, generalmente de agua dulce pero también marinas (Sawyer y colaboradores, 1977) y en algunas tan insólitas como las aguas minerales de consumo habitual como bebida, gaseosa o no, donde las han encontrado Jadin y Willaert (1972b) y Desmet-Paix (1974), o en los acuarios domésticos, en algunos de los cuales nos dan fe de su existencia Anderson y Jamieson (1972) por un lado y Jadin (1973) por otro, advirtiendo que estos últimos casos se trataba de amebas del género *Naegleria*, siempre sospechosas de ser patógenas, aunque Anderson y Jamieson no lograron demostrar esta condición en las que aislaron.

Pero dos de los biotopos habitados por amebas anfizoicas patógenas o por lo menos, presuntamente patógenas, son particularmente inquietantes.

En primer lugar figuran las conducciones de agua de las ciudades. En 1974, es decir, mucho antes de que se promoviese el interés de los sanitarios por las amebas limax, Rafalko había señalado la presencia de *Naegleria gruberi* en condiciones de agua de consumo y, ya en plena época del interés por estas amebas, fueron Anderson y Jamieson (1972) los primeros que consiguieron aislar hasta diez cepas de *Naegleria* patógenas en una agua de canalización que había sido clorada, aunque no filtrada. Fue, sin embargo, Jadin quien entre 1972 y 1973 practicó la búsqueda sistemática más extensa que se ha realizado hasta la fecha. Este eminente investigador probó primeramente en el agua de los grifos de su laboratorio y, hallándola positiva en cuanto a la presencia de amebas en un número bastante importante, pues en uno de los casos alcanzó la cifra de 100,000 amebas por litro (Jadin y Willert, 1972b; 1973).

La investigación del Profesor belga se extendió a continuación a las aguas de las redes de distribución de varias ciudades de Bélgica y a la de treinta de distintas ciudades de Europa, de América y de Asia, encontrando que, con excepción de las aguas colectadas en cuatro ciudades, Niza, Barcelona, Djedda y Singapur, todas las demás mostraron la presencia de amebas. Por cierto que Jadin no hace comentario alguno sobre la excepción que suponen estas cuatro ciudades, pero debemos suponer que esta "prueba negativa" no debe de ser demasiado válida para afirmar taxativamente la mejor sanidad de las aguas de estas ciudades ya que, por lo menos en los ensayos llevados a cabo en Bélgica, que le permitían repetir periódicamente los análisis, Jadin fue con frecuencia testigo de resultados inconstantes, en los que aguas de las misma procedencia dieron una veces resultados positivos y otras negativos.

Más importante, al parecer, para la salud pública es la contaminación por *Naegleria* de las piscinas, singularmente de las de agua caliente, pues son las que han proporcionado el mayor número de casos de meningoencefalitis amebiana primitiva. En la actualidad se puede calcular en algo más de un centenar los casos indudables de esta enfermedad que han sido publicadas en el mundo.

Pues bien, un buen número de estos casos se produjeron en forma de brotes epidémicos en sujetos nadadores que frecuentaban piscinas, como los 17 casos de una piscina en Usti (Checoslovaquia) publicados por Cervá y Novák (1968) y los 3 de una piscina de Anvers (Bélgica) diagnosticados por Jadin y colaboradores (1971), a los que se pueden añadir los 16 casos observados en el Estado de Virginia en 1971, que Duma y colaboradores consideran como procedentes de una misma fuente de contaminación, ya que todos los paciente frecuentaban tres lagos situados en un radio de cinco millas, cerca de Richmond.

²Willaert (1974) hizo una recopilación de los 84 casos que se habían diagnosticado hasta dicha fecha. Se registraron 74 fallecimientos.

Claro está que el origen de la contaminación amebiana de las piscinas está en todo caso en el agua que se utiliza para llenarlas y, dado que las aguas de la red de abastecimiento suelen estar, como queda dicho, frecuentemente contaminadas, no debemos extrañarnos de que las piscinas también lo estén.

Pero es que, además, en las piscinas se dan unas condiciones muy favorables para el desarrollo de las amebas, por lo que el número de estos organismos llega a ser en ocasiones realmente muy considerable, habiéndose contado hasta un millón de amebas por litro en una piscina de agua caliente por Cervova y colaboradores (1972).

Estas condiciones son fundamentalmente dos: la temperatura y la abundancia de materia orgánica.

De todos es sabido que la temperatura del agua en las piscinas es siempre superior a las de otras colecciones

de agua: unas veces porque la piscina posee instalaciones adecuadas para calentar el agua; otras porque el agua detenida en la piscina, aunque se renueve por los aparatos de depuración, se calienta progresivamente por la irradiación solar.

Pues bien, se sabe que *Naegleria fowleri*, la ameba de mayor capacidad patógena en cuanto a la meningoencefalitis amebiana primitiva se refiere, se caracteriza por su adaptabilidad de vivir a temperatura relativamente elevadas, hasta tal punto que De Jonckheere y van de Voorde (1977b), que han encontrado esta especie en aguas termales de manantiales naturales y artificiales /De Jonckheere y colaboradores, 1975; De Jonckheere y van de Voorde, 1977a) utilizan como temperatura selectiva para su aislamiento la de 42° C y llegan a cultivar las amebas a 45° C, observando que a 42° C se mueven más activamente que a 37°C, lo que indica su adaptación a las altas temperaturas. Por otra parte, ya vimos que *N. jadini* no puede crecer ni siquiera a la temperatura del cuerpo humano, lo que se considera como una poderosa razón para su carencia de patogenicidad.

También es condición muy propicia para el desarrollo de las amebas limax la abundante cantidad de materia orgánica que de ordinario se acumula en las piscinas debido a su uso habitual, de modo que Jadin y Willaert (1972) refieren haber encontrado en diversas piscinas aglomerados orgánicos ricos en pequeños nemátodos (anguilúlidos), en bacterias y en amebas del género *Naegleria*.

En las piscinas y en las demás aguas estancadas, las amebas limax suelen encontrarse flotando con dichos aglomerados orgánicos o bien en las concreciones calizas que se forman en el fondo y en los bordes, concreciones que en corte se presentan, como dice Willaert y Le Ray (1973) "comme un labyrinthe dont les couloirs sont remplis de bacteries et d'amibes".

Después de los exámenes de las aguas de piscinas realizados por una serie de investigadores de varias partes del mundo (como, por ejemplo, Cerva, 1971; Cervova y colaboradores, 1972; Jadin y Willaert, 1972b; Jadin, 1973; Desmet-Paix, 1974; Derva y Huldít, 1974) se puede afirmar la certeza o, por lo menos, la suma probabilidad de que la mayor parte de las piscinas de todo el mundo, o al menos las de agua caliente, se hallen contaminadas por especies de amebas limax y, concretamente, por especies de *Naegleria*. Como me decía una vez Jadin a este respecto, y con toda razón, que él no podía creer que las piscinas de Bélgica estuvieran más contaminadas que las de los demás países.

El origen de las amebas anfitoicas en las piscinas se podría atribuir en principio a que se contaminan por el aire que aporta quistes de amebas, siempre presentes en este medio, como dijimos, pero los autores que han estudiado este tema (Jadin y Willaert, 1972) opinan que la contaminación por este tipo de organismos que se puede considerar como más importante se produce por el agua con la que se llena la piscina, la cual procede las más de las veces directamente de las redes de abastecimiento que, recordemos, suelen estar contaminadas. Es más, en algunas ocasiones, esta red de abastecimiento no desemboca directamente en la piscina sino que es previamente almacenada en un depósito que es el que irá a parar a la piscina misma: en este caso la contaminación puede ser de mucha envergadura, pues las amebas suelen multiplicarse ya en el depósito, por lo que su número llegará incrementado a la piscina.

Nos podemos preguntar ahora cual es la actitud a tomar ante los hechos que acabamos de relatar, con el fin de luchar contra la meningoencefalitis amebiana primitiva y contra las otras posibles afecciones causadas al hombre por las amebas anfitoicas con capacidad patógena, teniendo conciencia "a priori" de que esta lucha se presenta ardua y difícil, dadas las características de abundancia y ubicuidad de estas amebas.

En primer lugar, en mi opinión, es todavía necesario un gran esfuerzo en la investigación fundamental sobre estas amebas. Afortunadamente en los últimos años se ha progresado mucho en el aspecto de la identificación de las amebas limax, que es, evidentemente, un necesario primer paso para la lucha contra su acción patógena. Poseemos una serie de métodos muy sensibles que nos permiten una buena identificación, como son las técnicas de inmunofluorescencia, las de inmunoelectroforesis, las de inmovilización, las de aglutinación, etc. La aplicación de estas técnicas, unas modernas y otras más antiguas, a la identificación de las amebas que se aíslan y cultivan, llevada a cabo por un buen número de investigadores que sería prolijo enumerar, esta clarificando mucho este problema en los últimos años (véase Willaert, 1976).

Otro punto, íntimamente relacionado con lo anterior, sobre el cual es necesario investigar muy cuidadosamente, es el de la capacidad patógena no sólo de las diferentes especies, sino también de las diferentes cepas de éstas. En la actualidad es bastante fácil cultivar estas amebas y aun conservarlas en colección a temperatura muy bajas, pues se sabe que incluso mantenidas en ciertas condiciones a -72° C, no pierden su viabilidad, como se demuestra al descongelarlas (Mascaró y colaboradores, 1978). De este modo se tiene la posibilidad de mantener colecciones, a fin de comparar las cepas aisladas por los distintos investigadores de todo el

mundo.

Este punto es especialmente importante, no solamente porque este tipo de investigación aumentará nuestros conocimientos sobre las amebas, sino también porque podría tener trascendencia sobre la salud humana teniendo en cuenta que es muy posible que el número de cepas patógenas de *Naegleria fowleri* (por citar una especie típicamente patógena) no sea muy elevado. Concretamente, los investigadores que he citado anteriormente. De Jonckheere y van de Voorde (1977b) mencionan el aislamiento y cultivo que ellos han llevado a cabo de cepas no patógenas de dicha especie amebiana.

También se presenta como muy importante la investigación fundamental sobre la biología y sobre las condiciones de vida de las amebas anfizoicas en sus ambientes naturales habituales, es decir, cuando se comportan como exozoicas en las aguas.

Abordar desde este punto de vista el problema de las amebas es colocarse en una línea muy actual de la investigación microbiológica, que trata de enfrentarse con el concepto de comunidad microbiana natural, línea cuya necesidad se ve cada vez más evidente después de casi un siglo de estudiar los microorganismos en cultivos puros. Los ambientes naturales son asiento de numerosas interacciones entre los microorganismos que en ellos conviven y del estudio de dichas interacciones pueden seguir importantes conocimientos aplicables, no sólo a un saber especulativo sobre las amebas limax, sino también a la lucha contra ellas en cuanto organismos patógenos. Sólo a guisa de ejemplo mencionaré que varios autores han demostrado la acción de bacterias (Singh y colaboradores, 1958; Drozanski, 1961) y de extractos de bacterias y de hongos (Jehan y colaboradores, 1975; Datta y Kaur, 1978) sobre el exquistamiento de algunas amebas limax.

En segundo lugar, hay que plantear unas medidas sanitarias bien pensadas para impedir la incidencia de la meningoencefalitis amebiana primitiva o, al menos, los brotes epidémicos de esta afección. No es mi intención indicar aquí las medidas que habría que adoptar, que dejo a personas más expertas, pero si quiero hacer una observación, en mi opinión importante. Para luchar contra las amebas patógenas tienen que establecerse y dotarse laboratorios especializados y contarse con un personal médico y sanitario especialmente adiestrado para esta labor. Para aseverar esta necesidad, basta recordar la complejidad y la variedad de las técnicas empleadas para la identificación de las amebas limax, necesaria de todo punto para la lucha contra las patógenas, así como comprobar que a medida que los médicos de todo el mundo empiezan a preocuparse por este tema va aumentando el número de casos diagnosticados de meningoencefalitis amebiana primitiva.

Por último, otra actitud a tomar ante esta nueva enfermedad es la de no alarmarse demasiado, sin perjuicio, por supuesto, de la adopción de las medidas médicas y pertinentes adecuadas.

En primer lugar, y aunque se pueda alegar que muchos casos permanecen en la actualidad ocultos por falta de diagnóstico, se trata de una afección no frecuente. A pesar de la extraordinaria abundancia de las amebas limax en las aguas (que Bovee, 1970, afirma haber hallado casi en todas las muestras que ha examinado durante 25 años de su estudio) al parecer no existe una correlación con los casos observados de la enfermedad. Recientemente Wellings y colaboradores (1977) refieren que entre los nadadores de las aguas de los lagos de Orlando, en el estado de Florida, en las que se puede observar la presencia de gran cantidad de amebas patógenas del género *Naegleria*, sólo se han diagnosticado cinco casos de meningoencefalitis amebiana primitiva durante los doce años transcurridos entre 1962 y 1974.

Por añadidura, en cuanto a la presencia de las amebas patógenas en las piscinas, que podría ser alarmante tanto para los sanitarios como para el común de las gentes, hay que decir que tampoco estamos inermes. Hará falta, como he dicho anteriormente, todavía mucha investigación fundamental hasta que sepamos combatir de manera absolutamente segura a las amebas anfizoicas patógenas, pero en principio podemos decir que aunque Cerva (1971) opina que el cloro no basta para limpiar de amebas las piscinas, Jadin y Willaert (1972) opinan todo lo contrario, habiendo realizado estos autores experimentos para determinar la resistencia de las amebas patógenas del género *Naegleria* y demostró muy convincentemente que la supercloración de las aguas permite destruir, no solamente a los trofozoitos de estas amebas, sino también a sus quistes.

Para terminar, haré un breve comentario sobre el interés que las amebas anfizoicas y, especialmente, la meningoencefalitis amebiana primitiva están despertando actualmente entre protozoólogos, parasitólogos, médicos y veterinarios. Este interés es difícil de evaluar pero se puede afirmar que es considerable. Bastará para demostrarlo el dato siguiente: Solamente en dos de las reuniones celebradas por protozoólogos en 1978, la de la Society of Protozoologists y las del Grupo de Protozoólogos Checoslovacos, de un total de 125 comunicaciones presentadas entre ambas reuniones, nada menos que ocho trataban de amebas anfizoicas, de las cuales siete sobre *Naegleria*. El número no parece muy grande, pero relativamente lo es, si se tiene en cuenta: el corto número

de comunicaciones total; la amplitud del campo de la protozoología; que se trataba de congresos no internacionales, sino nacionales; y finalmente, que en estos grupos no suelen estar integrados ni suelen asistir médicos ni veterinarios en su mayoría.

Otro dato que nos puede ilustrar sobre la actitud de los hombres de ciencia ante este problema tan actual es el de las personas que están especialmente interesadas en el tema de las amebas anfitriónicas.

Con el temor de incurrir en algún olvido lamentable, pero con la seguridad de mencionar a investigadores bien conocidos en este campo, podemos decir que las personas y grupos que más se destacan en la actualidad en el estudio de dichas amebas son Govinda S. Visvesvara, de Atlanta, Estado Unidos, Lubor Cerva y sus colaboradores, entre los que destaca Vit Kandlec, que forma el grupo de Praga, y Jean Baptiste Jadin, hoy ya jubilado, que fue el maestro de otro importante grupo en Anvers (Bélgica), grupo en el que figuran su hijo Jean Marie Jadin y Eddy Willaert.

En España comienza ahora a despertarse cierto interés por este problema y la sede del nuevo grupo está en el Instituto "López Neyra" de Parasitología, en Granada, cuyo Director, Diego Guevara-Pozo, ha marcado a algunos de sus discípulos el tema de las amebas limax para su investigación. Fruto de la labor de este grupo son las dos comunicaciones que los componentes de este grupo presentaron en agosto de 1978 en el Cuarto Congreso Internacional de Parasitología de Varsovia (Guevara-Benitez y colaboradores, 1978; Mascaró y colaboradores, 1978), así como los tres trabajos que tienen en prensa (véase Guevara-Pozo, 1978), todos ellos sobre diferentes aspectos de las amebas limax. Igualmente, en la segunda Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles, que mantuvimos en Madrid durante los días 27 y 28 de octubre último se han presentado tres comunicaciones sobre estos organismos debidas a autores del grupo de Granada (Fluviá y colaboradores, 1978; Batista y colaboradores, 1978; Mascaró y colaboradores, 1978), cuya actividad no decae.

Espero que en los próximos años, la labor de los investigadores que hasta la fecha se han ocupado de estas amebas anfitriónicas, sea muy fructífera y sirva de acicate para que se incorporen a ella nuevos científicos que consigan que dentro de poco estos organismos no constituyan ya un problema para la salud humana.

PUBLICACIONES CITADAS

- ALEXEIEFF, A., 1912. Sur les caractères cytologiques et la systematique des Amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannella* nov. gen.= et des Amibes parasites des Vertebres (*Proctamoeba* nov. gen.). *Bull. Soc. Zool. France*, 37: 55-74.
- APLEY, S., S.K. CLARKE and A. ROOME, 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.*, 1: 596-599.
- ANDERSON, K. and A. JAMIESON, 1972. Agglutination test for the investigation of the genus *Naegleria*. *Pathology*, 4: 273-278.
- ARMSTRONG, J.A. and M.S. PEREIRA, 1967. Identification of "Ryan Virus" as an ameba of the genus *Hartmannella*. *Brit. Med. J.*, 1: 212-214.
- BATISTA, N., C. MASCARO, D.C. GUEVARA y A. OSUNA, 1978. Patogenicidad de amebas limax en ratones albinos. Comunicación a la Segunda Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles, Madrid. Octubre de 1978.
- BHAGWANDEEN, S.B., R.F. CARTER, K.G. NAIK and D. LEVITT, 1975. A case of hartmannellid amoebic meningoencephalitis in Zambia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 63: 483-492.
- BLANTON, W.E. and C.L. VILLEMEZ, 1978. Molecular size and chain length distribution in *Acanthamoeba cellulose*. *J. Protozool.*, 25: 264-267.
- BOVEE, E.C., 1970. Comments on the biology of small free-living amoebas of disease potential. Proc. 2nd Int. Congr. Parasitol. *J. Parasitol.*, 56 (Sect. 11): 32-33.
- BUTT, C.G., C. BARO and R.W. KNORR, 1968. Pathogenic progress in amoebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 50: 568-574.

- CARTER, R.F., 1970. Description of a *Naegleria* species isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 100: 217-244.
- CARTER, R.F., 1972. Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66: 193-208.
- CASTELLANI, A., 1930. An amoeba found in a culture of a yeast. Preliminary note. *J. Trop. Med. Hyg.*, 33:160.
- CERVA, L., 1971. Studies on limax amoebae in a swimming pool. *Hydrobiologia*, 38: 141-161.
- CERVA, L. and G. HULDT, 1974. Limax amoebae in five swimming pools in Stokolm. *Folia Parasitol.*, 21: 75-77.
- CERVA, L. and K. NOVAK, 1968. An outbreak of amoebic meningoencephalitis. *Amer. J. Epidem.*, 160: 92.
- CERVA, L., V. ZIMAK and K. NOVAK, 1969. Amoebic meningoencephalitis: Axenic cultures of *Naegleria*. *Science*, 163: 575-576.
- CERVOVA, H., L. CERVA, L. MACK and V. JOHNOVA, 1972. Quantitative follow up study of the frequency of limax group amebas in the Podok swimming pool. *Cs. Epidem.*, 21: 203-210.
- CHANG, S.L., 1978. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl. Envir. Micro.*, 35: 368-375.
- CHATTON, E., 1953. Classe des Lobosa. Ordre des amoebiens nus ou Amoebaea. *In: Grassé, Traité de Zoologie*, T. I, fasc. 11, pp. 5-91
- CHATTON, E. et LALUNG-BONNAIRE, 1912. Amibe limax (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l' intestin humain. Son importance pour l'interpretation des amibes de culture. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 5:135-143.
- CHI, L., J.E. VOGEL and A. CHELOKOV, 1959. Selective phagocytosis of nucleated erithrocytes by cytotoxic amoebae in cell culture. *Science*, 130: 1763.
- CULBERTSON, C.G., 1971. The pathogenicity of soil amebas. *Am. Rev. Microbiol.*, 25: 231-252.
- CULBERTSON, C. G., J. W. SMITH, H. K. COHAN and J.R. MINNER, 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Amer. J. Pathol.*, 35: 185-197.
- DATTA, T. and J. KAUR, 1978. Effect of fungal extracts on excystment of soil amoebae. *Protistologica*, 14: 121-123.
- DE JONCKHEERE, J. and H. VAN DE VOORDE, 1977a. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 26:10-15.
- DE JONCKHEERE, J. and H. VAN DE VOORDE, 1977b. Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to nonpathogenic variants of *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.*, 24: 304-309.
- DE JONCKHEERE, J., P. VAN DIJK and H. VAN DE VOORDE, 1975. The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *J. Hyg.*, 75: 7-13.
- DESMET-PAIX, L., 1974. Recherche systematique d'amibes dans les eaux des piscines et les eaux minérales. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 54: 409-414.
- DROZANSKI, W., 1961. The influence of bacteria on the excystment of soil amoebae. *Acta Microbiol. Polon.*, 10: 147.
- DUMA, R.J., 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. *Crit Rev. Clin. Lab. Sci.*, 3:163-192.
- DUMA, R.J., J.B. SHUMACKER and J.H. CALLICOT, 1971. Primary amebic meningoencephalitis. A survey in Virginia. *Arch. Envir. Healrh*, 23: 43-47.
- FERNÁNDEZ-GALIANO, D., 1975. Tres errores de Sachedinn. *Real Soc. Españ. de Hist. Nat. Primer Centenario (1871-1971)*. Tomo II: Trabajos Científicos de Biología, pp. 143-150.

- FLUVIA, C., C. MASCARO y D.C. GUEVARA, 1978. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas minerales. Comunicación a la Segunda Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Madrid, octubre de 1978.
- FOWLER, M. AND R.F. CARTER, 1965. Acute pyrogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Brit. Med. J.*, 2: 740-742.
- GUEVARA-BENITEZ, D.C. M.N. BATISTA-DIAZ, M.C. MASCARO-LAZCANO, A. OSUNA-CARRILLO and D. GUEVARA, 1978. Pathogenic capability of *Acanthamoeba* sp. on white mice. Comunicación al IV International Congress of Parasitology. Warzawa, agosto de 1978.
- GUEVARA POZO, D., 1978. Las amebas limax. Discurso de apertura del curso académico 1978-79 en la Universidad de Granada. Secretario de Publicaciones de la Universidad de Granada.
- HEWITT, R., 1937. The natural habitat and distribution of *Hartmannella castellani* (Douglas), a reported contaminant of bacterial cultures. *J. Parasitol.*, 23: 491-495.
- JADIN, J.B., 1973. De la méningo-encéphalite amibienne et du pouvoir pathogene des amibes "limax". *Ann. Biol.*, 12: 305-342.
- JADIN, J.B. et E. WILLAERT, 1972a. Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive à *Naegleria grüberi* observés à Anvers (Belgique). *Protistologica*, 8: 95-100.
- JADIN, J.B. et E. WILLAERT, 1972b. Au sujet de la dispersion des amibes du groupe "limax". *Protistologica*, 8: 505-508.
- JADIN, J.B., J. HERMANNE, G. ROBYN, E. WILLAERT, Y. VAN MAERCKE et W. STEVENS, 1971. Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés à Anvers (Belgique). *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, 51: 255-266.
- JAGER, B. et W. STAMM, 1972. Brain abscess caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkins disease. *Lancet*, ii: 1343-1345.
- JAHNES, W.G., H.M. FULLMER and C.P. LI, 1957. Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96: 484-488.
- JEHAN, M., G.P. DUTTA, D.C. KAUSHAL and O.P. SKULA, 1975. Effect of bacteria and fungal extracts and metabolic inhibitors on excystment of soil amoebae. *Indian J. Exp. Biol.*, 13: 357-377.
- KADLEC, V., 1978. The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animals. *J. Protozool.*, 25: 235-237.
- KINGSTON, D. and D.C. WARHURST, 1969. Isolation of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol.*, 2: 27-36.
- MASCARO, C., C. FLUVIA, N. BATISTA, A. OSUNA y D. GUEVARA, 1978. Pruebas sobre criopreservación de amebas limax. Comunicación a la segunda Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Madrid, octubre de 1978.
- MASCARO, C., C. FLUVIA, N. BATISTA, A. OSUNA and D. GUEVARA, 1978. Isolation and identification of limax amoebae from fresh water. Comunicación al IV International Congress of Parasitology. Warzawa, agosto de 1978.
- NAGINGTON, J., P.C. WATSON, J.J. PLAYFAIR, J. MCGILL, B.R. JONES and A.D. McSTEEL, 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet*, ii: 1537-1540.
- NAGLER, K., 1909. Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amoben. *Arch. Protistenk*, 15:1-53.
- NEFF, K.J. and W. F. BENTON, 1962. Localization of cellulose in the cyst of *Acanthamoeba* sp. *J. Protozool.*, 9 (Suppl.): 11.
- NEFF, R.J., W.F. BENTON and R.H. NEFF, 1964. The composition of the mature cyst wall of the soil amoeba *Acanthamoeba* sp. *J. Cell. Biol.*, 23-66 (Abstr.).

- PAGE, F.C., 1967a. Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 14: 499-521.
- PAGE, F.C., 1967b. Re-definition of the Genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.*, 14: 709-724.
- PAGE, F.C., 1974a. *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida Fiabelluidae), and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozool.*, 13: 143-155.
- PAGE, F.C., 1974b. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.*, 116: 149-184.
- PAGE, F.C., 1975. Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae=*Protistologica*, 11: 195-204.
- PUSSARD, M., 1973. Modalités de la division nuclaire et taxonomie chez les amibes (Amoeba, Protozoa). Révision des notions de promitose, mésomitose et métamitose. *Protistologica*, 9: 163-173.
- PUSSARD, M. et R. PONS, 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie chez les amibes du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13: 557-598.
- RAFALKO, J., 1947. Cytological observations on the amoeba flagellate *Naegleria gruberi*. *J. Morphol.*, 81: 1-34.
- ROBERT, V.B. and L.B. RORKE, 1973. Primary amebic encephalitis, probably from *Acanthamoeba*. *Ann. Int. Med.* 79: 174-179.
- SAWYER, T.K., G.S. VISVESVARA and B.A. HARKE, 1977. Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with description of *Acanthamoeba hachetti* n. sp. *Science*, 196:1324-1325.
- SCHARDINGER, F., 1899. Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (Gymnamoeba): *Amoeba gruberi*. *Sitzb. Kaiserl. Akad. Wiss. Wiens*, 108: 713-734.
- SCHAUDINN, F., 1903. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arb. Kaiserl. Gesundh.*, 19: 547-576.
- SHIN, L.E. and P.B. HADLEY, 1936. Note on the spontaneous contamination of a bacterial culture by an Organism resembling *Hartmannella castellani*. *J. Infec. Dis.*, 58: 23-27.
- SINGH, B.N., 1952. Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. *Phil. Trans. Roy Soc. London, ser. B.*, 259: 405-461.
- SINGH B.N. and S.R. DAS, 1970. Studies on pathogenic and non pathogenic small free-living amoebae and its bearing of nuclear division on the classification of the Order Amoebida. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, ser. B.* 259: 435-461.
- SINGH, B.N., S. MATEW and N. ANAND, 1958. The role of *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* and certain amino acids in the excystment of *Schyzopyrenus ruselli*. *J. Gen. Microbiol.*, 19: 104-111.
- SKOCIL, V., R. DVORAK, J. STERBA, J. SLAJS., SERBUS and L. CERVA, 1972. Epidemiological study of the incidence of amoebas of the limax group in military communities. V. Relation between the presence of amoebas of the limax group in nasal swabs and pathological finding in nasal mucosa. *J. Hyg. Epidemiol Microbiol. Immunol. (Praga)*, 16: 101-106.
- STEVENS, A.R., T. KILKPATRICK, E. WILLAERT and A. CAPRON, 1967. Serological analyses of cell-surface antigens of *Acanthamoeba* spp. with plasma membrane antisera. *J. Protozool.*, 24: 316-324.
- TOMLINSON, G. and E.A. JONES, 1962. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil ameba. *Biochim Biophys. Acta*, 63: 194-200.
- VISVESVARA, G.S. and W. BALAMUTH, 1975. Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J. Protozool.*, 22: 245-156.

- VISVESVARA, G.S. and G.R. HEALY, 1978. Experimental studies on a new isolate of *Naegleria fowleri* (strain HB-4) (abstr.). *J. Protozool.*, 25: 28A.
- VISVESVARA, G.S., D. JONES and N. ROBINSON, 1975. Isolation, identification and biological characterization of a *Acanthamoeba polyfaga* from a human eye. *Am. Trop. Med Hyg*, 24: 784-790.
- WANG, S. and H. FELDMAN, 1961. Occurrence of *Acanthamoeba* in tissue cultures inoculated with human pharyngeal swab. *Antimicrob. ag. Chemother.*, 1: 50-53.
- WEISMAN, R.A., 1976. Differentiation in *Acanthamoeba castellani*. *Ann Rev. Microbiol.*, 30: 189-219.
- WELLINGS, F.M., A.L. LEVIS, P.Y. AMUS and S.L. CHANG, 1977. *Naegleria* and water sports. *Lancet*, i: 99-200.
- WELLS, T.R., 1911. Aerial contamination as a fallacy in the study of amebic infections. *Parasitology*, 4: 204-219.
- WILLAERT, E., 1974. Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 54: 429-440.
- WILLAERT, E., 1976. Etude immuno-taxonomique des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebida). *Acta Zool. Pathol. Antverp.*, 65: 6-239.
- WILLAERT, E. et D. LE RAY, 1973. Caracteres morphologiques, biologiques et immunochimiques de *Naegleria jadini* sp. nov. (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica*, 9: 417-426.
- WILLAERT, E. and A.R. STEVENS, 1976. Indirect immuno fluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Path. Biol.*, 24: 545-547.
- WILLAERT, E., A R. STEVENS and R.L. TYNDALL, 1978. *Acanthamoeba royreba* sp. n. from a human tumor cell culture. *J. Protozool.*, 25: 1-14.