

ACANTHAMOEBA SPP. UN AGENTE OPORTUNISTA EN INFECCIONES HUMANAS

ACANTHAMOEBA SPP. AN OPPORTUNISTIC AGENT HUMAN INFECTIONS

A. Martín Cabello-Vílchez

Universidad Peruana Cayetano Heredia

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo *Acanthamoeba* spp. el género más aislado del suelo, aire, aguas tratadas para consumo, agua de mar, lagos y aguas termales. El presente trabajo aborda las características de *Acanthamoeba* spp., su biología, las patologías que afectan a humanos; además, el diagnóstico microbiológico y molecular, que es una herramienta que ha venido mejorándose con el avance de la tecnología. La clave es la identificación de la ameba, para lograr una buena intervención clínica y terapéutica. Finalmente exponemos las combinaciones terapéuticas exitosas en los escasos reportes clínicos existentes.

Palabras clave: amebas de vida libre, *Acanthamoeba* spp., meningoencefalitis, encefalitis granulomatosa amebiana (EGA).

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are widely distributed in nature, *Acanthamoeba* spp. is the species isolated from soil, air, treated water for consumption, sea water, lakes and hot springs. In this paper, approach the characteristics of *Acanthamoeba* species biology, diseases affecting humans and the microbiological and molecular diagnosis is a tool that has been being improved with the advancement of technology. The key is Amoeba identification for a good clinical and therapeutic intervention. Finally we present the successful therapeutic combinations on the limited existing clinical reports.

Keywords: free-living amoebae, *Acanthamoeba* spp., meningoencephalitis, granulomatous amoebic encephalitis (GAE).

a Lab. Protozoarios y Endosimbiontes (LPE)
Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt",
Av. Honorio Delgado N° 430, San Martín de Porres.
Lima-Perú
Teléfono: (511) 98976-7619
alfonso.cabello@upch.pe

I. INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son microorganismos eucarióticos [célula eucariota: del griego *eu*, 'bien' o 'normal', y *karyon*, 'nuez' o 'núcleo']; incluyen los organismos formados por células con núcleo verdadero, a los animales, plantas, hongos y protistas. El reino Protista, también denominado "Protoctista", es el que contiene a todos aquellos organismos eucariontes que no pueden ser clasificados dentro de los otros tres reinos eucariotas: Fungi (hongos), Animalia (animales) o Plantae (plantas). Es un grupo parafilético, eucariotas unicelulares descendientes de una eucariota ancestral unicelular.

El reino Protista constituye un taxón parafilético que se basa en el carácter plesiomórfico (es el estado ancestral o primitivo de un carácter) de la unicelularidad. La pluricelularidad se desarrolló independientemente en varios grupos de Eukarya: Animalia, Fungi, Plantae, *Heterokontophyta* y *Rhodophyta*. Solo los dos últimos se clasifican dentro del reino Protista. 'Protoctista' fue una denominación propuesta por la doctora Lynn Margulis y compartida por su maestro R. H. Whittaker en 1969. La doctora Margulis quiso establecer la prioridad con el nombre griego *Protoctista* ('primeras criaturas' o 'primigenios'), propuesto por J. Hogg en 1860, sobre el nombre griego *Protista* ('primerísimos' o 'primordiales')¹.

Actualmente existen más de 100 especies de amebas de vida libre (AVL), algunas de ellas pertenecen al género *Acanthamoeba*. La única especie conocida del género *Balamuthia*, *B. mandrillaris*, y solo una especie del género *Naegleria*, *N. fowleri*, son conocidas como causan-

tes de enfermedades en humanos^{2,3}. Las infecciones causadas por AVL son consideradas como enfermedades raras, se trata de patógenos oportunistas; han sido descritas tres especies causantes de lesiones neurológicas: *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y *Naegleria fowleri*, y algunas especies de *Acanthamoeba spp.* han sido registradas en diversas partes del mundo, incluido el trópico^{4,5}.

Las dos primeras y el género *Acanthamoeba spp.* son conocidas como causantes de *Encefalitis Granulomatosa Amebiana* (EGA); y la tercera como *Meningoencefalitis Amebiana Primaria* (MAP) por *Naegleria fowleri*. La infección puede adquirirse por el contacto con agua o suelo contaminados^{4,5,6,7,8}.

Las AVL por lo general ingresan por la cavidad nasal y atacan al sistema nervioso central (neurotropismo); pero también pueden ingresar a través de la piel, causando enfermedad en individuos inmuno-competentes e inmuno-deficientes. EGA afecta el sistema nervioso central (SNC), con una duración de entre unas pocas semanas a dos años. MAP es una infección aguda y fulminante en el SNC, principalmente en los niños y los adultos jóvenes que han tenido contacto con el agua dulce; de 5 a 7 días, el paciente muere^{9,10}.

II. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Acanthamoeba se incluía en la Familia Hartmannellidae en 1912 (Alexeieff). Fue descrita por primera vez por Sir Aldo Castellani en 1930, cuando reportó la presencia de una ameba en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus*. M. Douglas denominó a la ameba como *Hartmannella castellanii* en el género *Hartmanne-*

lla, pero posteriormente fue reclasificado como *Acanthamoeba castellanii*. Solo en 1931 se estableció su género, donde se ubican las amebas similares con numerosas proyecciones espinosas, superficiales, conocidas como acantopodios¹¹.

En 1931, Volkonsky subdividió el género *Hartmannella* en tres géneros, basado en algunas características: *Hartmannella* se caracteriza por tener un quiste de pared lisa y redonda. *Glaeseria* se caracteriza por la división celular del quiste. *Acanthamoeba* se caracteriza por tener acantopodios, formas de espinas que sobresalen de su cuerpo y se divide por mitosis; además, los quistes son de doble pared con bordes ondulantes externos^{12,13}.

En 1958, Clyde Culbertson *et al.*¹⁴, demostraron el potencial patogénico de las amebas en modelos de animales, induciendo una encefalitis en ratones tras la inoculación de una cepa de *Acanthamoeba* que había contaminado las células en cultivo durante la producción de la vacuna frente a la poliomielitis, en los Laboratorios Eli Lilly.

La cepa de *Acanthamoeba* sp. Lilly A-1, fue nombrada en honor al Dr. Clyde G. Culbertson y así se le denominó como *Acanthamoeba culbertsoni*^{15,16}.

En 1967, F. Page concluyó que la forma de las espinas era un criterio dudoso para la diferenciación de especie. Consideró que la presencia de acantopodias y la estructura de quistes pueden ser suficientemente distintivos para justificar la diferenciación de *Hartmannella* y *Acanthamoeba*¹⁷. En 1975, Sawyer y Griffin propusieron una nueva familia, *Acanthamoebidae*¹⁸.

III. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

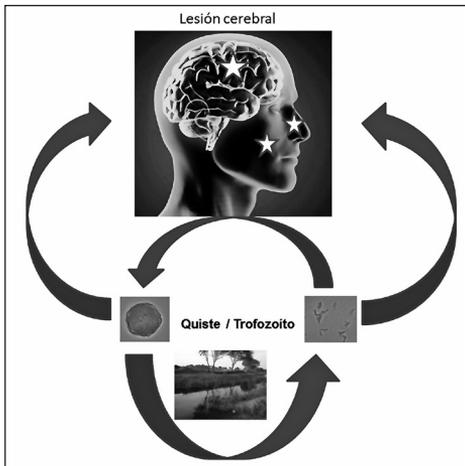
Las amebas de vida libre son patógenas. Los Protozoa consisten en cuatro grupos: Sarcodina (amebas); Mastigóforos (flagelados); Sporozoa (además de las formas esporas protozoos parásitos); e Infusoria (ciliados). Pero recientemente, la Sociedad Internacional de Protozoología abandonó la taxonomía clásica y creó un nuevo sistema basado en los enfoques morfológicos actualizados empleando vías bioquímicas y filogenética molecular¹⁹. De acuerdo con este nuevo esquema, los eucariotas se han clasificado en seis grupos o Super Grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata. *Acanthamoeba* y *Balamuthia* se incluyen en el Super Grupo Amoebozoa (*Acanthamoebidae*); *Naegleria fowleri* bajo el Super Grupo Excavata (Heterolobosia, Vahlkampfiidae) y Sappinia bajo el Super Grupo Amoebozoa (*flabellinea*, *Thecamoebidae*)¹⁹.

IV. CICLO BIOLÓGICO DE ACANTHAMOEBA

Acanthamoeba spp. tienen dos estadios en su ciclo de vida, uno de alimentación y reproducción en fase de trofozoíto; y un estado de quiste resistente. Son microorganismos aerobios poseedores de mitocondrias, que les permite completar su ciclo biológico en el medio ambiente. Los trofozoítos se alimentan de bacterias presentes en el medio ambiente y se multiplican por fisión binaria. Una característica única de *Acanthamoeba* spp. es la presencia de finos y estrechos pseudópodos en forma de espinas llamados acantopodias, que sobresalen de su superficie. Los trofozoítos varían en tamaño, de 15

a 45µm; y por lo general tienen un solo núcleo localizado en el centro; el núcleo es densamente teñido. El citoplasma es finamente granular y contiene numerosos mitocondrias, ribosomas, vacuolas alimenticias y una vacuola contráctil. Los quistes son de doble pared y varían en tamaño de 10 a 29 µm. La pared externa del quiste, el exoquiste, se encuentra arrugado con pliegues y ondulaciones, contiene proteínas y lípidos. La pared interna del quiste, el endoquiste, contiene celulosa y por lo tanto es ácido periódico de Schiff-positivo. Es estrellada, poligonal, oval o esférica. Los poros u ostiolos, en el cruce del exoquiste y el endoquiste están cubiertos por opérculos convexo-cóncavos que se abren en el momento del desenquistamiento. Los quistes son también uninucleados y poseen un nucléolo densamente colocado en posición central. Los quistes pueden resistir la desecación durante más de 20 años^{20,21} (Figura 1).

FIGURA 1
Ciclo de vida de *Acanthamoeba*, vía de infección al hombre



V. CLASIFICACIÓN DE ACANTHAMOEBA

Se ha incrementado el aislamiento de especies de *Acanthamoeba* spp., las que se han seguido clasificando con criterios

morfológicos. *Acanthamoeba* fue clasificada en tres grupos morfológicos I, II, III^{22,2}. Actualmente se ha optado por el análisis molecular, empleando una clasificación subgenérica basada en el análisis de secuencias del gen 18S ARNr para separar las cepas de *Acanthamoeba*. Actualmente, el género *Acanthamoeba* está clasificado en 20 genotipos basados en la pequeña unidad ribosomal del gen ARN (SSU rDNA o 18S rDNA) que los agrupa en genotipos T1- T20 (Tabla 1).

VI. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Acanthamoeba spp. es capaz de producir 4 entidades clínicas bien diferenciadas:

Queratitis amebiana: Se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. La infección progresa produciendo una ulceración de la córnea, de la que puede resultar ceguera en casos muy severos. Es una enfermedad difícil de tratar y de diagnosticar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de la queratitis herpética, fúngica o micobacteriana, lo que ocasiona que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen muchos meses. El cuadro clínico en sus inicios se caracteriza por limbitis, queratopatía punteada, infiltrados epiteliales, subepiteliales o perineurales. El paciente sufre enrojecimiento, lagrimeo, fotofobia y dolor de diversa intensidad, pero desproporcionado respecto a los signos oculares, así como visión borrosa. Al progresar la enfermedad, puede observarse ulceración, infiltrados anulares, placas endoteliales y uveítis anterior, con o sin hipopión (presencia de pus en la cámara anterior del ojo), y más infrecuentemente, edema corneal. Si el curso se agrava, pueden producirse abscesos, escleritis,

TABLA 1
Clasificación de los genotipos de *Acanthamoeba*
empleando 18S rDNA

Genotipo	Infección	Especies / Tipo
T1	Encefalitis	<i>A. castellanii</i>
T2A	No patógena	<i>A. palestinensis</i>
T2B	Queratitis	NA
T3	Queratitis	<i>A. griffini</i> , <i>A. pearcei</i>
T4	Queratitis, encefalitis	<i>A. echinulata</i> , <i>A. divionensis</i> , <i>A. lugdunensis</i> , <i>A. mauritaniensis</i> , <i>A. polyphaga</i> , <i>A. quina</i> , <i>A. rhysodes</i> , <i>A. triangularis</i> , <i>A. royreba</i>
T5	Queratitis, encefalitis	<i>A. lenticulata</i>
T6	Queratitis	NA
T7	NA	<i>A. astronyxis</i>
T8	NA	<i>A. tubiasbi</i>
T9	NA	<i>A. comandoni</i>
T10	Queratitis, encefalitis	<i>A. culbetsonii</i>
T11	Queratitis	<i>A. hatchetti</i> , <i>A. stevensoni</i>
T12	Encefalitis	<i>A. healyi</i>
T13	No patógena	NDA
T14	No patógena	NDA
T15	Queratitis	<i>A. jacobsi</i>
T16	No patógena	NDA
T17	No patógena	NDA
T18	Encefalitis	<i>A. byersi</i>
T19	NA	<i>Acanthamoeba micheli</i>
T20	NA	NDA

glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria^{8,10}.

Rinosinusitis: Se ha descrito la colonización de *Acanthamoeba* en cavidad

nasal^{24,25,26}; esto podría originar sinusitis crónica, como ya se ha observado en pacientes con VIH/SIDA²⁷. La rinosinusitis es una manifestación de la infección por *Acanthamoeba* que ha sido visto solo en

individuos inmunocomprometidos, particularmente aquellos con VIH/SIDA. Los signos y síntomas de *Acanthamoeba rhinosinusitis* son obstrucción nasal, costras y epistaxis. Puede haber necrosis de hueso y del cartílago en la cavidad nasal bordeada de mucosa eritematosa. La mayoría desarrolla cuadros severos y fallecen. Hay ocho casos documentados de *Acanthamoeba rhinosinusitis* en la literatura mundial^{28,29,30,31,32}, solo dos de los cuales han sido tratados con éxito^{29,30} (Tabla 2).

Acantamebiasis diseminada: Es una condición clínica poco frecuente, pero que puede producir la muerte en pacientes inmuno-suprimidos. Las infecciones cutáneas causadas por *Acanthamoeba* son más comunes en los pacientes con VIH/SIDA, con o sin afectación del SNC^{33,34,35,36,37,38,39} (Tabla 2).

La enfermedad cutánea también ha sido documentada en los pacientes infectados con encefalitis amebiana sin VIH; pero también en pacientes sometidos a terapia inmunosupresora para el trasplante de órganos^{46,47}. El 75 % de los casos presenta lesión cutánea, usualmente pustulosa, nodular y ulcerosa.

Meningoencefalitis granulomatosa: Las amebas de vida libre pueden afectar el sistema nervioso central (SNC). El término Encefalitis Granulomatosa Amebiana-EGA (en inglés GAE, *granulomatous amebic encephalitis*) ha sido usado para referirse a infecciones del SNC causadas por *Acanthamoeba spp.* y/o *Balamuthia mandrillaris*. La ruta de invasión al SNC en los casos de EGA es probablemente a través de las vías respiratorias inferiores (Figura 1). Dentro de los síntomas clínicos característicos de esta patología están las alteraciones en el estado mental, cambios en el comportamiento, convulsiones, cefalea,

afasia, fiebre, rigidez de cuello, alteración de la visión, anorexia, náuseas y vómitos, ataxia, que derivan en coma y muerte^{18,20}.

VII. PATOGÉNESIS E INMUNIDAD

Patogenia: La patogenicidad de las especies de *Acanthamoeba* es incuestionable. Que algunos de estos genotipos son altamente virulentos es también algo evidente, dados los síntomas y el grado de la enfermedad en los casos clínicos en infecciones humanas. Sin embargo, estas amebas necesitan de huéspedes inmunocomprometidos o que tengan una deficiencia inmune (inmunosupresión transitoria) que facilite su transformación en parásito facultativo (de quiste a trofozoíto). El mecanismo por el cual el parásito invade los tejidos y produce lesiones es desconocido por el momento; sin embargo, se ha demostrado la presencia de proteasas, que suelen ser factores importantes para la sobrevivencia del parásito⁴⁸.

La patogénesis de la acantamebiasis es un proceso complejo que involucra varios factores orquestados para producir la enfermedad. El primer paso crítico es su adhesión a la superficie de los tejidos^{49,50} a través de la expresión de una proteína transmembrana de aproximadamente 130 kDa, conocida como proteína ligada a manosa-PLM (en inglés: *mannose-binding protein-MBP*), que se une a glicoproteínas que contienen manosa expresadas en las células blanco^{49,50,51}.

La adhesión del parásito a la célula huésped está mediada por una proteína de unión a manosa de 130 kDa (MBP) expresada en la superficie de *Acanthamoeba*^{50,51}. La proteína MBP *Acanthamoeba castellanii* (Neff) consta de 6 exones y 5

intrones que se expresan en 3,6 kpb⁵². Otras adhesinas descritas en este género incluyen a una proteína de unión a la laminina con una masa molecular de 28,2 kDa, una proteína de unión a laminina 55 kDa y una adhesina de > 207 kDa^{53,54}.

El papel principal de la MBP es permitir a la ameba adherirse a la célula hospedadora. Esta observación se demostró al emplear metil- α -D manopiranos, lo que bloquea a los receptores de manosa y no permite la adhesión de las amebas. Se demuestra así que *Acanthamoeba* necesita este receptor para iniciar su invasión del huésped^{55,56}; seguidamente se iniciaría la secreción de enzimas proteolíticas como las serín proteasas.

Acanthamoeba secreta tres tipos de proteasas: serín-proteasas, cisteín-proteasas y metalo-proteasas, de vital importancia en el proceso de patogénesis de esta ameba. En el caso de las serín-proteasas, se han identificado varias con diferentes pesos moleculares: 12, 27, 33, 36, 40, 42, 47, 49, 55, 60, 66, 75, 97, 100, 107, 110, 133, 157 y 230 kDa. En el caso de las cisteín-proteasas, se han identificado proteínas con pesos moleculares de 24, 43, 59, 65, 70 y 130 kDa^{57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67}.

Subsecuente a la adhesión, la ameba produce diferentes enzimas hidrolíticas como las proteasas que hemos mencionado, pero también fosfolipasas, que trabajan en conjunto para producir un potente efecto citopático que involucra el incremento en la concentración de Ca⁺⁺, cambios en la estructura del cito-esqueleto y en la morfología celular, aumento en la permeabilidad de la membrana celular y mitocondrial, degradación de la matriz extracelular y, finalmente, la muerte de la célula⁵². Muy recientemente

se han descrito algunas otras actividades enzimáticas que le permiten invadir a su hospedero, como por ejemplo: elastasa, metaloproteasa^{68,69}.

Dos estudios han demostrado suficientes evidencias que sugieren que la activación de receptores activados por proteasas PAR-2, por el serina proteinasas, juegan un papel importante en las respuestas innatas e inflamatorias de la infección de córnea y las vías aéreas^{70,71}. La presencia de la actividad de DNasa ha sido demostrada muy recientemente por Iqbal *et al.*, 2015⁷².

Inmunidad: Los seres humanos desarrollamos anticuerpos frente a *Acanthamoeba* debido a su ubicuidad⁷³. Si este anticuerpo natural resulta en una inmunidad protectora frente a las infecciones por *Acanthamoeba* spp., esto se desconoce^{74,75,76,77,78}.

Estudios previos han demostrado que existen anticuerpos frente a *Acanthamoeba* en el suero de los soldados sanos, así como en los pacientes hospitalizados en Checoslovaquia, los adultos y los niños de Nueva Zelanda, y los pacientes hospitalizados por problemas respiratorios^{20,76,79}.

Los anticuerpos frente a *Acanthamoeba* se han demostrado en pacientes que desarrollaron EGA y/o lesiones en la piel, y también se ha detectado anticuerpos frente a *Acanthamoeba* en pacientes con queratitis amebiana.

Los estudios inmunológicos en poblaciones hispanas no se han realizado correctamente⁷⁸; es muy probable que los niveles de anticuerpos sean altísimos debido a que estas poblaciones están constantemente expuestas y colonizadas

TABLA 2
Lista de casos clínicos de infecciones por Acanthamoeba en pacientes con VIH en los últimos 30 años

Autor	Edad/Sexo	CD4 ³	Síntomas	Lesiones	Terapia	Targa	Resultado
Gonzalez <i>et al.</i> (1986) ³³	29/H	NR	Sinusitis, congestión, epistaxis	Lesión cutánea	Rifampicina, ketoconazol	NO	MUERTE
Friedland <i>et al.</i> (1992) ⁴⁰	8/H	50/ μ L	Descarga nasal	Sinusitis, lesión cutánea	Ketoconazol, 5FC	NO	MUERTE
Helton <i>et al.</i> (1993) ³⁴	33/H	0	Fiebre, sinusitis	Sinusitis, lesión cutánea	Ketoconazol, 5FC	NO	MUERTE
Cugino <i>et al.</i> (1995) ⁴²	34/H	NR	Dolor de cabeza	Sinusitis	Pentamidina + itraconazol	NO	MUERTE
Sison <i>et al.</i> (1995) ⁴²	2 casos, 30/H, 33/H	NR	Congestión crónica de senos, nódulo cutáneo	Sinusitis, lesión cutánea	5FC, Itraconazol, amfotericina	NO	MUERTE
Murakawa <i>et al.</i> (1995) ³⁵	47/H	< 200/ μ L	Congestión crónica de senos, lesión cutánea	Sinusitis, lesión cutánea	Ninguno (1 caso); metronidazol, 5FC(1 caso); ketoconazol, pentamidina, (1 caso)+ anfotericina B (1 caso)	NO	MUERTE
	34/H	7/ μ L	Lesiones sin curar en las piernas	Lesión en la piel, sinusitis, anemia, pérdida de peso	Metronidazol, 1g fluorocitocina oral 4 veces/día.	NO	MUERTE
	45/H	26/ μ L	-----	Sinusitis crónica, lesiones ulcerativas en la muñeca y mano.	Antibióticos y cirugía	NO	MUERTE
	35/H	119/ μ L	Síncope, fiebre, tos	Lesión cutánea en la pierna	Ketoconazol, pentamidina, flucitocina oral 200mg/d	NO	MUERTE
	36/H	20/ μ L	Infección <i>M. avium</i> , PCP	Sinusitis crónica, úlcera nasal, lesión en las piernas	Ketoconazol, pentamidina, fluconazol, itraconazol, metronidazol, amfo B.	NO	MUERTE

Dunand <i>et al.</i> (1997) ²⁷	37/H	178/ μ L	Congestión senos nasales, congestión, dolor facial	Sinusitis, lesión cutánea	5FC	NO	MUERTE
Casper <i>et al.</i> (1999) ²⁹	29/M	2/ μ L	Sinusitis, congestión, epistaxis	Sinusitis, lesión cutánea	5FC, itraconazol	AZT	MUERTE
Landres B (2000) ⁴³	41/H Bisex	80/ μ L	Sinusitis	Edema de la mucosa nasal, úlcera necrótica	Fluconazol, anfotericina, rifampicina, trimetropim, sulfametoxazol, propamida, atovaquona	SÍ (zidobudina)	SOBREVIVE
Teknos T <i>et al.</i> (2000) ³¹	45/H	NR	Sinusitis	Úlcera necrótica	Itraconazol	NO	NO SE INDICA
Rivera MA <i>et al.</i> (2002) ³⁰	37/H	NR	Sinusitis, obstrucción nasal bilateral	Úlcera (extirpación de la lesión)	Pentamidina, ketoconazol, 5FC, pentamidina, itraconazol	NO	SOBREVIVE
Carter <i>et al.</i> (2004) ⁴³	35/M	50/ μ L	Sinusitis	Lesión ulcerativa región caudal	Pentamidina, levofloxacino IV, anfotericina, flucitocina, rifampicina, itraconazol	SÍ	SOBREVIVE
Nachega <i>et al.</i> (2005) ²⁹	37/H	76/ μ L	Dolor facial	Sinusitis, lesión cutánea	Itraconazol, rifamp, 5FC	D4T,3TC,N-VP	SOBREVIVE
Dickson M <i>et al.</i> (2009) ²⁸	37/H	100/ μ L	Dolor facial	Sinusitis	Itraconazol, anfotericina, 5FC	AZI,3TC,-DDI, INDIRAVIR	SOBREVIVE
Galarza C <i>et al.</i> (2009) ⁴⁵	35/H	10/ μ L (may 98)	Descarga nasal purulenta, dolor facial, dolor seno frontal	Perforación ulcerativa 1cm en septum nasal	Pentamidina, anfotericina, 5FC	NO	MUERTE
	25/H	NR	Lesión ulcerativa	Úlcera necrótica	Anti-tbc, itraconazol, anfotericina B	NR?	MUERTE
	31/M	NR	Lesión ulcerosa	Úlcera necrotizante	Itraconazol	NR?	MUERTE
	22/H	NR	Lesión ulcerosa	Úlcera necrotizante	Antimonioato n-metilglucamina	?	MUERTE

por amebas de vida libre, sobre todo en el Perú²⁶. La inmunidad humoral y la activación del complemento parecen ser los mecanismos de defensa primarios frente a la infección por *Acanthamoeba* spp. Los principales anticuerpos séricos son de clase IgM y IgG. Ambos anticuerpos y el complemento promueven el reconocimiento de *Acanthamoeba* por células fagocíticas. Las amebas son destruidas por los neutrófilos, los cuales son activados por linfoquinas que aceleran la combustión celular y generan enzimas lisosomales. Los macrófagos y neutrófilos son las células que hacen frente a las amebas.

Las inmunoglobulinas del suero no difieren significativamente entre pacientes y sujetos saludables con infección con queratitis *Acanthamoeba* o EGA; pero los niveles de IgA específicos para *Acanthamoeba* en lágrimas fueron significativamente menores en pacientes con queratitis^{73,80}.

Se conoce que la infección por *Acanthamoeba* induce una respuesta granulomatosa; la respuesta en los pacientes con VIH/SIDA se encuentra disminuida o es ausente; estos hallazgos son consistentes con una pobre respuesta inmune. Los casos de EGA han sido reportados como enfermedades crónicas y en pacientes inmunológicamente deteriorados; sin embargo, algunos pacientes aparentemente no tienen definido el factor predisponente o inmunodeficiencia⁸¹.

VIII. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de EGA se obtiene de la historia del paciente, así como de los síntomas, aunque los signos clínicos suelen confundirse con otras entidades

clínicas, como por ejemplo tumores cerebrales o infecciones bacterianas severas. El diagnóstico puede ser realizado por observación directa del LCR, piel o cualquier otra muestra clínica, pero por lo general el LCR en el cual visualizamos el trofozoíto en movimiento o biopsia de piel fijada o triturada y teñida con Azul de Metileno, Giensa o Wright.

Las muestras de LCR pueden centrifugarse a 700g por 10 minutos y luego se monta una gota en fresco en una lámina y se observa a 100x y 400x; las amebas suelen adherirse a la superficie de la lámina. Las biopsias fijadas y teñidas con H&E se pueden observar bajo el microscopio de luz 400x y 1000x (Figura 2).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* tienen de 15 a 45µm de longitud y poseen un solo núcleo con un nucléolo central. Los quistes son de 10 a 25 µm de diámetro y tienen doble pared. Poseen dos capas y un poro cercano al opérculo. Frecuentemente los quistes poseen formas poligonales.

Medios de cultivo

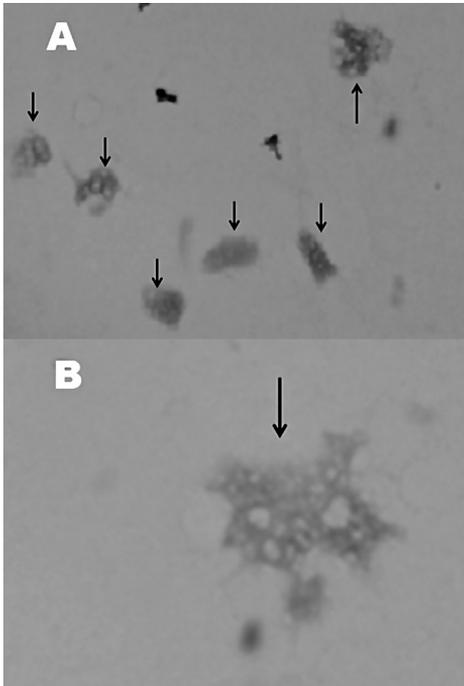
El *gold standard* para *Acanthamoeba* es la técnica del cultivo^{82,83,23}.

- **Agar no Nutritivo ANN (Monoxénico)**

El material obtenido de las biopsias de piel, cerebral, córnea, LCR y otros deben ser colocados en una pequeña porción de material biológico en la placa de agar no nutritivo (ANN) al 2 %, que está cubierta con una microcapa de *E. coli* (0.5 Mc Farland, aproximadamente). Se empleará el agar base como solidificante y la solución Page (10X) ANN: NaCl: 120mg, MgSO₄ x 7H₂O: 4mg, Na₂HPO₄:

FIGURA 2

A. Biopsia de piel humana, tejido triturado y teñido con Ziehl-Neelsen, se observa de color azul (gris oscuro) los trofozoítos de *Acanthamoeba* por el azul de metileno (400x).
B. Trofozoíto de *Acanthamoeba* en LCR teñido con Ziehl-Neelsen (flecha negra).



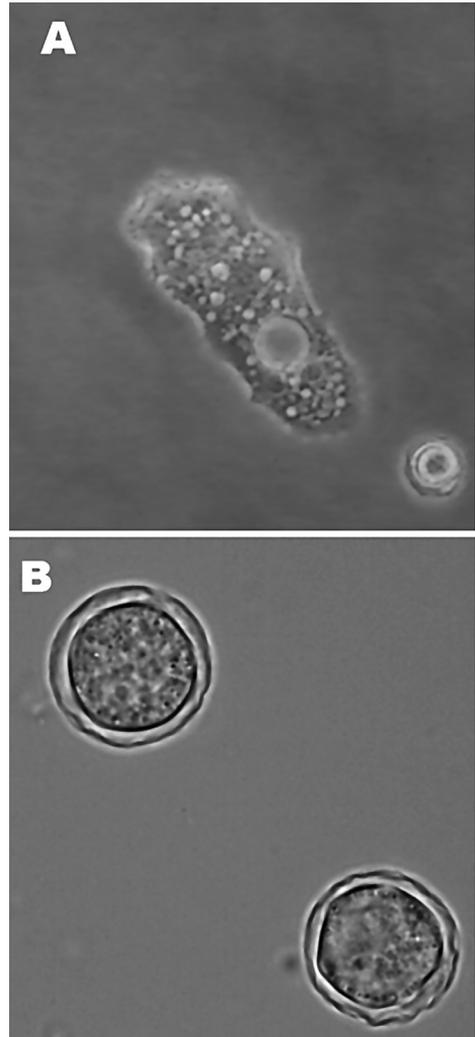
142mg, KH_2PO_4 136mg, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 4mg, 1L de H_2O destilada. Se disuelve en orden de lista en agua destilada, y se dispensa 100mL en 900mL de H_2O ; luego se agrega 20g de agar y se esteriliza en autoclave. Se dispensa en placas de 90mm de diámetro. Se cubre con *E. coli* viva; la superficie de la placa debe estar completamente seca. La muestra se deja en el centro de la placa de ANN; las placas deben ser cubiertas con parafilm®, incubadas a 30 °C y revisadas diariamente para ver la presencia de las amebas. Lo mejor es emplear microscopio de contraste de fase. En algunas ocasiones depende de las cepas aisladas (severidad de la infección); estas pueden ser visualizadas a las 48h de incubación. Sin embargo, las placas deben ser incubadas al menos una semana

para observar *Acanthamoeba*, y entre 3 y 6 semanas para otras amebas (Figura 3).

En los cultivos, las formas de los quistes son típicos y pueden ser identificados empleando los manuales de Page FC 1983, 1988 y 1991 (esta última versión fue publicada en alemán). Los quistes pueden ser clasificados empleando los criterios de Pussard y Pons *et al.* 1977⁸⁴.

FIGURA 3

A. Trofozoíto en cultivo axénico (PYG): 15 días de cultivo en frascos de cultivo 25cm².
B. Quistes de *Acanthamoeba* en cultivo monoxénico, genotipo T4.



Grupo I, caracterizado por quistes grandes ($>18 \mu\text{m}$) con endoquiste estrellado y ectoquiste esférico (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, y *A. tubiashi*). Grupo II, quistes más pequeños ($< 18 \mu\text{m}$) endoquiste poligonal y ectoquiste arrugado (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. mauritaniensis*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. hatchetti*, y *A. triangularis*). Grupo III, con quistes pequeños ($< 18 \mu\text{m}$), endoquiste redondo o suavemente angular y ectoquiste ligeramente arrugado (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* y *A. royreba*).

Muchos casos de queratitis *Acanthamoeba* son causados por el grupo II, pero el grupo III también ha sido reportado. El grupo II tiene de 3-7 brazos, mientras en el grupo III son redondeados y no se ve claramente la presencia de brazos. Muchas veces no son suficientes los datos morfológicos para clasificar la cepa; por ello es necesario analizar los genotipos. Los subcultivos son necesarios para conseguir poblaciones homogéneas; se toma una pequeña pieza agar (lo óptimo es escoger un solo quiste) y se transfiere a otra placa, este paso se repite cuantas veces sea necesario para separar cepas de amebas. Las placas de ANN pueden guardarse por muchos meses a temperatura ambiente; los quistes permanecen viables por muchos años, siempre que no se deshidraten por completo. Los cultivos de *Acanthamoeba* deberían realizarse en paralelo empleando $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $42 \text{ }^\circ\text{C}$ para detectar cepas termotolerantes. Las placas deben ser observadas diariamente bajo el microscopio.

• Medio de Cultivo Axénico (PYG)

Acanthamoeba spp. se cosechará de las placas de ANN, luego se centrifugará a 700-1000g durante 10 minutos en un tubo cónico de 50 ml, y entre 50 y 100 μl de

suspensión amebiana; se deberá transferir a frascos de cultivo de 25 cm^2 (Nunclon™ DELTA-Nunc™) con 5-9 mL de medio PYG. Posteriormente se incubarán los frascos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $42 \text{ }^\circ\text{C}$; se le agrega gentamicina 10 mg/ml o estreptomycin (Sigma)-penicilina (Sigma). El medio de cultivo PYG (*Peptone, Yeast Extract, Glucose*, ATCC 712) está formulado para *Acanthamoeba* spp. con las siguientes características: pH 6.5 \pm 0.2, Triptona (Oxoid) 20g; Extracto de Levadura (Oxoid) 2g, Glucosa 18g; los componentes se disuelven en solución Page en 1000 ml. Esta mezcla se autoclava y se deja enfriar para agregar estreptomycin-penicilina 200-400 mg/500mL de medio de cultivo. La incubación debe ser revisada diariamente para observar el crecimiento de trofozoítos y que no aparezca contaminación bacteriana^{82,83,85}. Algunas amebas pueden contener endosimbionte y en ese caso es casi imposible eliminarlo. Sin embargo, hay una técnica que podría eliminar al endosimbionte (o contaminante); esta consiste en emplear el medio monoxénico; luego de que todas las amebas se enquisten, se agrega HCl al 10 %, se incuban por 5 minutos y luego se debe lavar con solución Page; nuevamente se siembra en ANN hasta que crezca la cepa y luego debe sembrarse en medio axénico como el PYG.

Los medios líquidos no son útiles para el aislamiento primario de muestras clínicas debido a que pueden contaminarse con facilidad con bacterias y hongos (lágrima o raspado de córnea pueden no estar estériles).

• Cultivos empleando células de animales (Cultivo celular)

Los trofozoítos de cultivos monoxénico y axénico pueden ser transferidos directamente a los cultivos celulares. En el caso del medio monoxénico debemos tener

precaución por la posibilidad de sobrecrecimiento bacteriano. Se deben raspar las placas de agar sin romperlo; con una pipeta estéril tomar 50 μ L de suspensión y transferirlo al frasco de cultivo celular de 25 cm². Las muestras clínicas estériles como LCR, biopsia cerebral y líquido pleural pueden ser sembradas directamente en los frascos de cultivo celular, que deben contener una monocapa de células (*células HeLa*, *Hep-2*, *Keratinocitos*, *Neuroblastomas*, *células del endotelio cerebral humano*) y otras células animales como *células VERO*, que permita el crecimiento de las amebas; la destrucción de la monocapa en 24 horas es signo de alta citopatogenicidad⁸⁵.

IX. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Varios investigadores han utilizado muchos tipos de métodos no morfológicos para la clasificación taxonómica de *Acanthamoeba* spp.; entre ellos están los siguientes: análisis de isoenzimas; RFLP del ADN mitocondrial (Mt ADN); RFLP del ADN ribosomal de la subunidad pequeña (SSU rDNA); y el análisis de la secuencia de SSU rDNA, este último recientemente aplicado. Actualmente se ha desarrollado un método más prometedor, el cual analiza la secuencia de ARN 18S ribosomal del ADN (ADNr 18S). El gen nuclear 18S ARNr y el loci mitocondrial 16S ARNr de *Acanthamoeba* sp. poseen características únicas y útiles para los análisis de la determinación del genotipo.

En eucariotas, los ARNr (ribosomales) 5S, 5.8S y 28S forman parte de la subunidad mayor de los ribosomas, mientras que el ARNr 18S forma parte de la subunidad menor.

• Segmentos del gen 18s ARNr de *Acanthamoeba*

El amplímero que fue designado como ASA.S1, Amplímero-Acanthamoeba específica S1, mostró ser interesante con suficientes variaciones para distinguir los tipos de secuencias de ADNr 18S de genotipos que se han descrito anteriormente⁸⁶. Un grupo de cebadores adicionales para PCR se diseñó para producir un gran amplímero designado GTSA.B1, Amplímero Genotipo-Específico B1 (Figura 4). El amplímero GTSA.B1 puede entonces ser subdividido en tres fragmentos variables, designados DF1, DF2 y DF3, los que pueden ser secuenciados independientemente y representados por los tres segmentos en el diagrama de GTSA.B1. DF3 representa una región del gen que también está dentro del amplímero ASA.S1. Este subsegmento del amplímero ASA.S1 puede ser analizado usando el cebador 892C como un cebador de secuenciación, produciendo una secuencia de aproximadamente 200-250 pares de bases, que incluye la mayoría de las porciones muy variables de la región ASA.S1; este segmento designado DF3 es el que se encuentra más a la derecha en GTSA.B1 en la Figura 5. Los segmentos ASA.S1 o DF3 contienen una parte significativa de la señal filogenética que existe en toda la molécula 18S rRNA.

• Tipificación molecular de especies de *Acanthamoeba*

La clasificación molecular de aislados de *Acanthamoeba* spp. está basada en la amplificación y secuenciación del gen casi completo Rns⁸⁶. Veinte genotipos han sido descritos: T1 – T20^{86,87,88,89,90}. Partes del gen (Rns) contienen suficientes diferencias en sus secuencias que son filogenéticamente relevantes. Estas secuen-

FIGURA 4
Regiones secuenciadas del GTSA.B1 del (178-355) DF1; (705-926) DF2; (1175-1379),
corresponde 204 pb) DF3. Abarca las regiones E23-2' y E-23-6 del 18S rDNA.

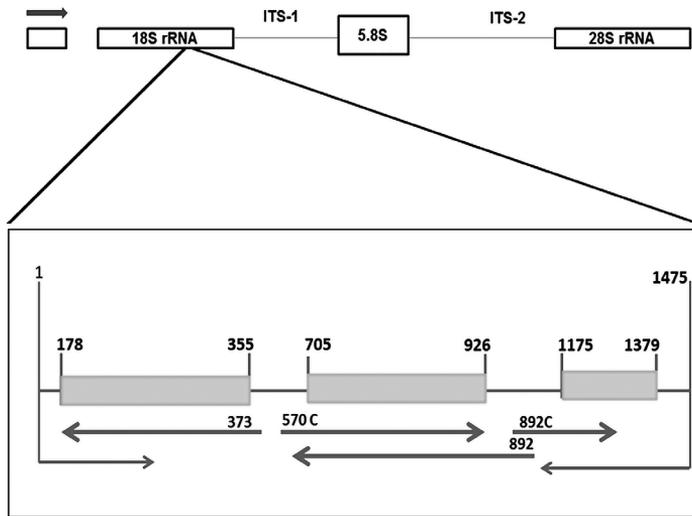


FIGURA 5
Regiones variables dentro del GTSA.B1

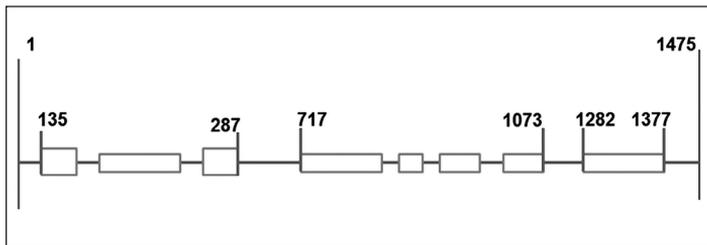
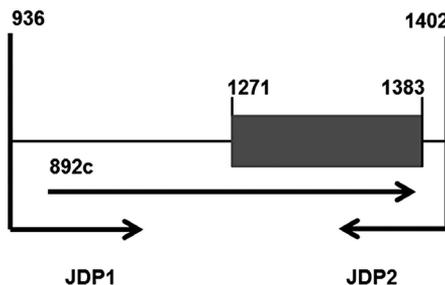


FIGURA 6
Región secuenciada del ASA.S1;
en gris oscuro la región DF3.



Tomado de Schroeder *et al.*, 2001.

El análisis de secuencias del gen completo Rns o de la región DF3 es útil para la caracterización de los varios genotipos de *Acanthamoeba* en muestras clínicas y ambientales. Alrededor del 90 % de *Acanthamoeba* aislada que ha sido asociada a la queratitis amebiana y proviene de diferentes áreas geográficas ha sido descrita como genotipo T4^{92,93,94}. El genotipo T4 también es predominante en infecciones como EGA; pero también se ha demostrado la presencia de otros genotipos implicados en EGA: T1, T2, T5, T7, T10 y T12^{10,95,96,97,98}.

cias corresponden a la región variable DF3 del amplímero ASA.S1 obtenido de los cebadores JDP, el cual discrimina muchos de los genotipos de *Acanthamoeba*⁹¹.

El análisis completo del gen de la subunidad pequeña mitocondrial del ARNr (mitocondrial small-sub-unit

rRNA) (rns) confirma la identidad de los genotipos de *Acanthamoeba* basados en el gen rns. Recientemente se ha demostrado que ITS 1 es una región variable más útil que el gen rns y que los grupos del ITS-1 correlacionan con los grupos del rns. ITS 1 es diez veces más variable que la región del gen rns; por ello puede ser usado para discriminar genotipos dentro de otros genotipos como el T4⁹⁹.

- **Cebadores y PCR para regiones de 18S de *Acanthamoeba***

El uso de la técnica de reacción de polimerasa en cadena-RPC (en inglés *polymerase chain reaction-PCR*) es común en muchos laboratorios. En el PCR convencional: la región blanco para el PCR estándar para *Acanthamoeba* fue la subunidad pequeña nuclear ARNr (en inglés *nuclear small-subunit rRNA* [rns]).

El amplicón ASA.S1 contiene la región DF3 y este es amplificado por los cebadores:

JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACC-GTGAA-3') y

JDP2 (5'TCTCACAAGCTGCTAGG-GGAGTCA-3').

Cebadores usados para obtener la secuencia de la región DF3:

892 (5'-CCAAGAATTTACCTCT-GAC-3') y

892C (5'-GTCAGAGGTGAAATTC-TTGG-3').

Cebadores empleados para la secuenciación en una sola dirección del GTSA. B1:

373 (5'-TCAGGCTCCCTCTCCG-GAATC-3') 178 a 355: 177 bp

570C (5'-GTAATTCCAGCTCCAA-TAGC-3') 705 a 926: 221 bp

Los cebadores denominados ACARNA: *forward* 5'-TCC CCT AGC AGC TTG TG-3' y *reverse* 5'- GTT AAG GTC TCG TTC GTT A-3' han demostrado ser útiles por múltiples investigadores para identificar *Acanthamoeba*; el producto es de 272pb¹⁰⁰ y el par de cebadores Nelson fue diseñado para producir un amplicón cercanamente idéntico al que genera el cebador PIGP^{100,101}. La secuencias de los cebadores Nelson son presentados aquí; *forward* 5' GTT TGA] GGC AAT AAC AGG T 3', *reverse* 5' GAA TTC CTC GTT GAA GAT 3'.

Recientemente se ha desarrollado un PCR para el diagnóstico de *Acanthamoeba*^{100,101,102,103,104}. El diagnóstico puede ser realizado en LCR, lavado bronquio-alveolar, tejido cerebral y otros tejidos. Resultados positivos se obtienen de tejido embebido y parafinado y fijado con formaldehído, pero estas pruebas tienen limitaciones en su sensibilidad y reproducibilidad¹⁰⁴.

X. TRATAMIENTO

El 98 % de los casos de EGA fallecen. Sin embargo, algunos pacientes han sobrevivido después de la terapia larga con múltiples agentes antimicrobianos, incluyendo pentamidina, itraconazol, 5-fluorocitosina, rifampicina, cotrimaxazole y miltefosina^{105,106,107,108,109,110,111,112}. Actualmente se recomienda isotionato de pentamidina IV 4mg/kg de peso corporal / 24 horas; sulfadiazina 500 mg diarios, pirimetamina 50 mg una vez al día; voriconazol 200 mg dos veces al día y la miltefosina (150mg/día), luego 100mg por siete meses^{113,114}.

XI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La meningoencefalitis granulomatosa por *Acanthamoeba* spp. T4 o *Balamuthia mandrillaris* es una entidad clínica muy rara en el mundo. Los clínicos deberían estar más familiarizados con la enfermedad; pero la baja frecuencia de necropsias suele ser un factor que ocasiona la pérdida de información valiosa para establecer la real epidemiología de la enfermedad, con mayor importancia en pacientes inmuno-suprimidos, como los pacientes con leucemias, linfomas, trasplantes y con VIH/SIDA.

Las pruebas de diagnóstico molecular para AVL están fuera del alcance de muchos laboratorios en la costa del Perú (zonas de mayor frecuencia de casos por AVL).

Es importante que el Ministerio de Salud del Perú desarrolle un programa de vigilancia epidemiológico como lo dispone México.

Finalmente, nuestro objetivo principal es encontrar una terapia efectiva y una prueba de diagnóstico certera para los pacientes que sufren de estas afecciones.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Margulis L. *Una revolución en la evolución. Poder para los protoctistas*. Pp. 110-111. Colección Honoris Causa. Universitat de València. Valencia, 2003.
2. Amoebae on the Web. Web-site dedicated to systematics and identification of naked lobose amoebae. Disponible en: <<http://amoeba.ifmo.ru/>>.
3. The Amoebae. Disponible en: <<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smacer/amoebae.htm>>.

5. Martínez AJ. Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. CRC Press, Boca Raton, FL 1985.
6. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 2003; 16: 273–307.
7. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 2004; 34: 1001–1027.
8. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30: 564–595.
9. Martínez AJ. Free-Living Amebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba* and *Balamuthia* In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 81.
10. Khan NA. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. J Med Microbiol. 2008; 57(Pt 9): 1051–7.
11. Visvesvara G S. Classification of *Acanthamoeba*. Rev Infect Dis 1991; 13 Suppl 5: S369–72.
12. Castellani A. An amoeba found in culture of a year: preliminary note. J Trop Med Hyg. June 2, 1930, p 160; second note: July 1, 1930, p 188; third note: August 1, 1930, p 221.
13. Douglas M. Notes on the classification of the amoeba found by Castellani on culture of yeast-like fungus. J Trop Med Hyg, 1930; 33: 258–59.
14. Culbertson CG, Smith JW, Minner JR et al. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. Science. 1958; 127: 1506.
15. Jahnes W G, Fulmer H M, Li CP. Free-living amoeba as contaminants in monkey kidney tissue cultures (23515). Proceed Soc Exp Biol Med 1957; 96: 484–8.

16. Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK, Minner JR. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* 1959; 35: 185–97.
17. Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with description of three species. *J. Protozool.* 1967; 14: 709–724.
18. Visvesvara GS, Maguire JH. Pathogenic and opportunistic free-living amebas: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. In: RL Guerrant, DH Walker, PF Weller (Eds.), *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice*. Vol. 2. Churchill Livingstone (Elsevier), Philadelphia, 2006, pp. 1114–1125.
19. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 2005; 52: 399–451.
20. Visvesvara GS, Roy SL, Maguire JH. Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebae. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia pedata*. Chapter 101. In: Richard L. Guerrant, David H. Walker, and Peter F. Weller, Edited. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, 3ed Hardcover. 2011. Pp. 707–713.
21. Visvesvara GS. Pathogenic and Opportunistic Free-living Amoebae: Agents of Human and Animal Disease. Chapter 50.
22. Pussard M, Pons R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 1977; 13: 557–610.
23. Page FC. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Cumbria*, 1988. 122 p.
24. Cerva L, Serbus C, Skocil V. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol. (Praha)*. 1973; 20, 97–103.
25. Badenoch PR, Grimmond TR, Cadwgan J, Deayton SE, Essery MSL, Hill BD. Nasal Carriage of Free-Living Amoebae. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1988; 1 (3), 209–211.
26. Cabello-Vilchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, González AC, Guerra H, Gotuzzo E, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in Peru. *Acta Trop.* 2013; 130C: 7–10.
27. Dunand VA, Hammer SM, Rossi R, *et al.* Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 267–72.
28. Dickson JM, Zetler PJ, Walker B, Javer AR. *Acanthamoeba rhinosinusitis*. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 38 (3): E87–90.
29. Nacheja JB, Rombaux P, Weynand B, Thomas G, Zech F. Successful treatment of *Acanthamoeba rhinosinusitis* in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS.* 2005 Oct; 19 (10): 621–5.
30. Rivera MA, Padhya TA. *Acanthamoeba*: a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2002; 112: 1201–3.
31. Teknos TN, Poulin MD, Laruentano AM. *Acanthamoeba rhinosinusitis*: characterization, diagnosis, and treatment. *Am J Rhinol* 2001; 14: 387–91.
32. Kim SY, Syms MJ, Holtel MR, *et al.* *Acanthamoeba sinusitis* with subsequent dissemination in an AIDS patient. *Ear Nose Throat J* 2000; 79: 171–4.
33. Gonzalez MM, Gould E, Dickinson G, Martinez AJ, Visvesvara G, Cleary TJ, Hensley GT. 1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and

- other opportunistic organisms. Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 749–751.
34. Helton J, Loveless M, White CR Jr. Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AID Spatient. Am. J. Dermatopathol. 1993; 15: 146–149.
 35. Murakawa GJ, McCalmont T, Altman J, Telang GM, Hoffman MD, Kantor GR, Berger TG. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. Arch. Dermatol. 1995; 131: 1291–1296.
 36. Duluol AM, Teilhac MF, Poirot JL. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp. in patients with AIDS. J. Eukaryot. Microbiol. 1996; 43: 130–131.
 37. Chandrasekar, PH, Nandi PS, Fairfax MR, Crane LR. Cutaneous infections due to *Acanthamoeba* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Intern. Med. 1997; 157: 569–572.
 38. Bonilla, HF, Whitehurst A, Kauffman CA. *Acanthamoeba sinusitis* and disseminated infection in a patient with AIDS. Infect. Med. 1999; 16: 397–400.
 39. Casper T, Basset D, Leclercq C, Fabre J, Peyron-Raison N, Reynes J. Disseminated acanthamoeba infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy. Clin. Infect. Dis. 1999; 29: 944–945.
 40. Friedland LR, Raphael SA, Deutsch ES, et al. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. Pediatr Infect Dis J 1992; 11: 404–407.
 41. Cugino L, Butcher J, Hoppes WL, Doyle M, Bogden C. *Acanthamoeba sinusitis* in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1995; 21: 795.
 42. Sison JP, Kemper CA, Loveless M, McShane D, Visvesvara GS, Deresinski SC. Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: Case reports and review. Clin Infect Dis 1995; 20: 1207–1216.
 43. Landres B. *Acanthamoeba Sinusitis* in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. Proceedings of UCLA Healthcare-Summer 2000; 4: (2): 4-7.
 44. Carter WW, Gompf SG, Toney JF, et al. Disseminated *Acanthamoeba sinusitis* in a patient with AIDS: A possible role for early antiretroviral therapy. AIDS Read 2004; 14: 41–49.
 45. Galarza C, Ramos W, Gutierrez EL, Ronceros G, Teran M, Uribe M, Navincopa M, Ortega-Loayza AG. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. Int J Dermatol. 2009; 48(12): 1324–9.
 46. Slater CA, Sickel JZ, Visvesvara GS, Pabico RC, Gaspari A. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. N. Engl. J. Med. 1994; 331: 85–87.
 47. Van Hamme C, Dumont M, Delos M, Lachapelle JM. Acanthamibiase cutanee chez un transplante pulmonaire. Ann. Dermatol. Venereol. 2001; 128: 1237–1240.
 48. Panjwani N, Zhao Z, Baum J, Hazlett LD, Yang Z. *Acanthamoebae* bind to rabbit corneal epithelium *in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38: 1858–64.
 49. Siddiqui R, Emes R, Elsheikha H, Khan NA. Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? Trends Parasitol 2011; 27: 185–9.
 50. Garate M, Marchant J, Cubillos I, Cao Z, Khan NA, Panjwani N. *In vitro* pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47: 1056–62.

51. Garate M, Cao Z, Bateman E, Panjwani N. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 2004; 279: 29849–56.
52. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 6.
53. Hong YC, Lee WM, Kong HH, Jeong HJ, Chung DI: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a laminin-binding protein (AhLBP) from *Acanthamoeba healyi*. *Exp Parasitol* 2004, 106: 95–102.
54. Rocha-Azevedo BD, Jamerson M, Cabral GA, Marciano-Cabral F: *Acanthamoeba culbertsoni*: Analysis of amoebic adhesion and invasion on extracellular matrix components collagen I and laminin-1. *Exp Parasitol* 2009, 126: 79–84.
55. Yang Z, Cao Z, Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infect Immun*. 1997; 65(2): 439–45.
56. Khan NA, Paget TA. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol*. 2002; 44(6): 444–9.
57. Khan NA, Jarroll EL, Panjwani N, Cao Z, Paget TA. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(8): 2858–61.
58. Alfieri SC, Correia CE, Motegi SA & Pral EM. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *J Parasitol* 2000; 86: 220–227.
59. Na BK, Kim JC, Song CY. Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *Microb Pathog*. 2001; 30(1): 39–48.
60. Alsam S, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood–brain barrier. *J. Infect*. 2005; 51, 150–156.
61. Sissons J, Alsam S, Goldsworthy G, Lightfoot M, Jarroll EL, Khan NA. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiol*. 2006; 6, 42.
62. Serrano-Luna JdeJ, Cervantes-Sandoval I, Calderón J, Navarro-García F, Tsutsumi V, Shibayama M. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can J Microbiol* 2006; 52: 16–23.
63. Dudley R, Alsam S, Khan NA. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 286: 9–15.
64. De Souza Carvalho FR, Carrijo-Carvalho LC, Chudzinski-Tavassi AM, Foronda AS, de Freitas D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17 (4): 603–9.
65. Moon EK, Hong Y, Chung DI, Kong HH. Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 185(2): 121–6.
66. Hadas E, Mazur T. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop Med Parasitol*. 1993; 44(3): 197–200.
67. Kim HK, Ha YR, Yu HS, Kong HH, Chung DI. Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. *Korean J Parasitol*. 2003; 41(4): 189–96.

68. Ferreira GA, Magliano AC, Pral EM, Alfieri SC. Elastase secretion in *Acanthamoeba* polyphaga. *Acta Trop*. 2009; 112(2): 156–63.
69. Alizadeh H, Li H, Neelam S, Niederkorn JY. Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by the mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. *Exp Eye Res*. 2008; 87(3): 286-91.
70. Tripathi T, Alizadeh H. Role of protease-activated receptors 2 (PAR2) in ocular infections and inflammation. *Receptors Clin Investig*. 2014; 1(6): pii: e2991.
71. Park MK, Cho MK, Kang SA, Park HK, Kim DH, Yu HS. *Acanthamoeba* protease activity promotes allergic airway inflammation via protease-activated receptor 2. *PLoS One*. 2014; 21: 9(3) e92726.
72. Iqbal J, Panjwani S, Siddiqui R, Khan NA. Partial characterization of *Acanthamoeba* castellanii (T4 genotype) DNase activity. *Parasitol Res*. 2015; 114(2): 457–63.
73. Ferrante A. Immunity to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991; 13: S403–9.
74. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol* 2006; 22: 175–80.
75. Alizadeh H, Apte S, El-Agha MS, et al. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 2001; 20: 622–7.
76. Cerva L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1989; 33: 99–103.
77. Kenney M. Micro-Kolmer complement fixation test in routine screening for soil ameba infections. *Health Lab Sci* 1971; 8: 5–10.
78. Chappell C, Wright JA, Coletta M, et al. Standardized methods of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 724–30.
79. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Microbiol* 2007; 50: 1–26 Review.
80. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(2): 273–307. Review.
81. Cabello-Vílchez AM, Rodríguez-Zaragoza S, Piñero J, Valladares B, Lorenzo-Morales J. *Balamuthia mandrillaris* in South America: an emerging potential hidden pathogen in Peru. *Exp Parasitol*. 2014; 145 Suppl: S10-9 Review.
82. Neff RJ. Purification, axenic cultivation, and description of a soil amoeba. *Acanthamoeba* sp. *J. Protozool*. 1957; 4: 176-182.
83. Page FC. Nackte Rhizopoda. In: *Nackte Rhizopoda und Heliozoa* (Eds. Page F.C. and Siemensma F.J.). G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1991; pp. 1–170.
84. Pussard M, Pons R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 1977; 13: 557–610.
85. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(3): 342–54. Review.
86. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol*. 1998; 45: 45–54.

87. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48: 4636–4640.
88. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol*. 2013; 60 (6): 626–33.
89. Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res*. 2014; 113 (8): 2845–50.
90. Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res*. 2015; 114 (7): 2481–90.
91. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (5): 1903–11.
92. Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DS, Byers TJ, Fuerst PA. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2002; 40 (5): 1621–5.
93. Fuerst PA, Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ. Genotypic identification of non-keratitis infections caused by the opportunistically pathogenic amoeba genus *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*. 2003; 50 Suppl: 512–3.
94. Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4): 1689–93.
95. Yagi S, Schuster FL, Bloch K. Demonstration of presence of *Acanthamoeba* mitochondrial DNA in brain tissue and cerebrospinal fluid by PCR in samples from a patient who died of granulomatous amoebic encephalitis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (6): 2090–1.
96. Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, Steuer A, Visvesvara G, Vetter N, Aspöck H. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan; 46 (1): 338–40.
97. Fuerst PA, Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ. Genotypic identification of non-keratitis infections caused by the opportunistically pathogenic amoeba genus *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*. 2003; 50 Suppl: 512–3.
98. Lackner P, Beer R, Broessner G, Helbok R, Pfausler B, Brenneis C, Auer H, Walochnik J, Schmutzhard E. Acute granulomatous *acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocrit Care*. 2010; 12(1): 91–4.
99. Köhler M, Leitner B, Blaschitz M, Michel R, Aspöck H, Walochnik J. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). *Parasitol Res*. 2006; 98(2): 86–93.
100. Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, Kilvington S, Keys MF, Matheson MM, Dart JK, McGill JI, Watt PJ. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39(7): 1261–5.

101. Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Ancelle T, Batellier L, Dupouy-Camet J, Chaumeil C. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26 (3): 221-4.
102. Yagi S, Schuster FL, Visvesvara GS. Demonstration of *Balamuthia* and *Acanthamoeba* mitochondrial DNA in sectioned archival brain and other tissues by the polymerase chain reaction. *Parasitol Res*. 2008 Feb; 102 (3): 491-7.
103. Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, Steuer A, Visvesvara G, Vetter N, Aspöck H. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (1): 338-40.
104. Yagi S, Schuster FL, Bloch K. Demonstration of presence of *Acanthamoeba* mitochondrial DNA in brain tissue and cerebrospinal fluid by PCR in samples from a patient who died of granulomatous amoebic encephalitis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (6): 2090-1.
105. Oliva S, Jantz M, Tiernan D, *et al.* Successful treatment of widely disseminated acanthamebiasis. *South Med J* 1999; 92: 55-7.
106. Vernon SE, Acar BC, Pham SM, *et al.* *Acanthamoeba* infection in lung transplantation: report of a case and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2005; 7: 154-7.
107. Walia R, Montoya JG, Visvesvara GS, *et al.* A case of successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba* infection in a lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 51-4.
108. Tang-Tat Fung K, Dhillon AP, McLaughlin JE, *et al.* Cure of *Acanthamoeba* cerebral abscess in a liver transplant patient. *Liver Transpl* 2008; 14: 308-12.
109. Singhal T, Bajpai A, Kalra V, *et al.* Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination of antimicrobials. *Pediatr Infect Dis* 2001; 20: 623-7.
110. Petry F, Torzewski M, Bohl J, *et al.* Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1903-4.
111. Martínez MS, Gonzalez-Mediero G, Santiago P, *et al.* Granulomatous amoebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3892-5.
112. Aichelburg AC, Walochnik J, Assadian O, *et al.* Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* spp. infection with Miltefosine. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(1): 743-6.
113. Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, Sifaoui I, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Voriconazole as a first-line treatment against potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from Peru. *Parasitol Res*. 2014; 113(2): 755-9.
114. Martínez DY, Seas C, Bravo F, Legua P, Ramos C, Cabello AM, Gotuzzo E. Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. *Clin Infect Dis*. 2010; 51(2): e7-11.