

Costamagna Sixto Raúl^{1,2}

RESUMEN: Los Amebas de Vida Libre (AVL) son protozoos que están presentes en la naturaleza y cumplen su ciclo de vida en el ambiente. Algunos géneros, de este grupo como *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* sp., *Balamuthia* sp. y *Sappinia* sp. pueden producir ocasionalmente, enfermedades graves en el hombre. Existen pocos reportes documentados sobre las patologías que las AVL provocan en el hombre y su epidemiología en Argentina. Hay numerosos casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp., muchos de los cuales se resolvieron con trasplante de córnea; al menos seis casos de Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG) producidos por *Balamuthia* sp., y recientemente, en febrero de 2017, un primer reporte con consecuencias fatales de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) provocada por *Naegleria fowleri* en la provincia de Buenos Aires. Como consecuencia de este caso, se aisló al protozoo de la laguna donde el niño fallecido se había bañado la semana previa. No se reportaron casos provocados por *Sappinia*. En esta breve revisión, se trata de brindar información regional sobre estos microorganismos, patologías que producen en el hombre, epidemiología y publicaciones existentes.

Palabras clave: Amebas de vida libre, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia*, Argentina.

ABSTRACT: The Protozoa called Free Living Amoebeae (FLA) are present in the nature and fulfill their life cycle in the environment. Some taxons of this group as *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* sp., *Balamuthia* sp., and *Sappinia* sp. can occasionally produce serious illness in man. There are few documented reports about pathologies caused in humans for the FLA and their epidemiology in Argentina. There are numerous cases of keratitis due to *Acanthamoeba* spp., many of them were solved through cornea transplant; at least six cases of Granulomatous Amoebic Encephalitis (GAE) produced by *Balamuthia* sp., and recently, in February 2017, the first fatal report of Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM) caused by *Naegleria fowleri* in the province of Buenos Aires. As a consequence of this case, the protozoan was isolated from the lagoon where the deceased had bathed a week before. No cases were reported caused by *Sappinia*. This brief review provides regional information on these microorganisms, pathologies produced in man, epidemiology and published papers.

Keywords: Free Living Amoebeae; *Acanthamoeba*; *Naegleria*; *Balamuthia*, *Sappinia*, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Las Amebas de Vida Libre (AVL) son protozoos anizoicos distribuidos ampliamente en la naturaleza. Son capaces de cumplir todo su ciclo de vida en el ambiente, sin necesitar otros hospedadores (Sandí y Moreira, 2014). En la actualidad, la International Society of Protistologists, en base a las características filogenéticas separaron a las AVL patógenas en dos Super Grupos, Amoebozoa y Excavata (Adl et al., 2012) (Tabla 1). Son cosmopolitas, y han sido aisladas de aguas dulces, saladas, del polvo ambiental, de verduras, de vertebrados e invertebrados y *Naegleria* spp., también de aguas termales (Pushkarew, 1913;

Khan, 2009, 2015; Costamagna et al., 2010, 2015; Valencia Vieira, 2012; Moussa et al., 2013; Baig, 2015; Siddiqui et al., 2016; Ong et al., 2017; Costamagna, 2018). Son agentes infecciosos primarios y oportunistas, siendo difícil su diagnóstico clínico, debido a lo agudo de sus cuadros, especialmente los que involucran al SNC y a la córnea (Stehr-Green et al., 1987; Visvesvara et al., 2007).

Pushkarew, en 1913 aisló por primera vez una ameba de polvo ambiental y la denominó *Amoeba polyphagus*; posteriormente, Page describió esta especie como *Acanthamoeba polyphaga* (Pushkarew, 1913; Singh, 1950; Pussard, 1966; Page, 1967). El

¹Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE-CONICET-Universidad Nacional de La Plata). Boulevard 120 s/n entre Avenida 60 y calle 64. 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina; ²Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Veterinaria. Cátedra de Parasitología Comparada. Calle 60 y 118 s/n (1900). Casilla de Correo 296. 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Tabla 1. Clasificación de los géneros patógenos de AVL*.

Super Grupo	Grupo	Sub-Grupo	Género
Amoebozoa	Myxogastria	Centramoeba	<i>Acanthamoeba</i> <i>Balamuthia</i>
Excavata	Discovata	Thecamoebida	<i>Sappinia</i> <i>Naegleria</i>

* Abreviada de Adl et al., 2013.

género había sido creado en 1931 (Volkonsky, 1931). En la actualidad, el género *Acanthamoeba* está dividido en 20 genotipos diferentes (T1- T20), considerando la variación en las secuencias de nucleótidos del gen 18S ARNr. Para esta genotificación se utilizaron los cebadores JDP1 y JDP2 para amplificar la región del ASA.S1 (Rns) que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal nuclear para obtener un amplímero DF3 (fragmento de diagnóstico 3) (Schroeder et al., 2001; Fuerst et al., 2015; Rojas et al., 2017). Los genotipos productores de queratitis son T4, T5 y T15. El genotipo más prevalente es T4, que es el más frecuente productor de patologías por *Acanthamoeba* en el Sistema Nervioso Central (SNC) aunque en pocos casos T1, T10 y T12 también han actuado como patógenos (Booton et al., 2002, 2005; Marciano Cabral y Cabral, 2003; Rojas et al., 2017).

Los primeros casos donde fehacientemente se determinó que algunas AVL podían producir enfermedad en el hombre, se reportaron a principios de los años setenta, por lo cual se las suele considerar como "agentes infecciosos facultativos emergentes", incluyendo casos de encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), queratitis amebiana (QA) e infecciones en piel provocados por *Acanthamoeba* y *Naegleria fowleri* produciendo meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) (Martínez et al., 1997; Oddó, 2006). Culbertson et al. (1958, 1959) observaron que amebas que contaminaban sus cultivos de tejidos, producían cuadros de meningoencefalitis en ratones y monos. Fowler y Carter (1965), describen el primer caso de meningoencefalitis por *Naegleria* sp., demostrando que este género podía producir un cuadro meníngeo muy grave y fulminante en el hombre. En 1966, Patras y Andujar, y luego Kenney en 1971, identificaron como pertenecientes a *Acanthamoeba* spp., protozoos aislados de autopsias de cerebro de pacientes humanos. Por otra parte, Carter en 1968, aisló una ameba del líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningoencefalitis y posteriormente, la tipificó como *Naegleria fowleri* (Carter, 1970). En 1991, se produjo un caso de encefalitis por *Balamuthia* sp. y Gelman et al. (2001, 2003) publicaron otro caso, provocado por *Sappinia diploidea* en un paciente de 38 años.

Las especies que se aislaron con mayor frecuencia en humanos fueron *Naegleria fowleri* (Carter, 1970) y *Acanthamoeba culbertsoni* (Culbertson et al.,

1958). En la naegleriosis, el ameboflagelado ingresa al cerebro y meninges a través de la mucosa nasal y el nervio olfatorio, causando MEAP. Algunas especies de *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris* invaden el cerebro y meninges, probablemente desde una lesión en piel y causan EAG. Además de provocar esta patología, algunas especies de *Acanthamoeba* (T4) generan lesiones en piel, con invasión secundaria al sistema nervioso central o sin ella y además, puede provocar infecciones de la córnea, generando lesiones graves que pueden llevar a trasplante de la misma o ceguera, ya que literalmente digiere la misma (Jarolim et al., 2000; Trabelsi et al., 2012).

Situación en Argentina

En Argentina, se han documentado y publicado diferentes casos clínicos de AVL. En 1991, se reportó un caso de encefalitis, pero estudios posteriores realizados en el Center for Disease Control (CDC) por Visvesvara, descartaron que fueran *Acanthamoeba* o *Naegleria fowleri*, ya que se trataría de una patología provocada por una ameba perteneciente al orden Leptomyxida, pero no por las dos especies mencionadas (Taratuto et al., 1991). En 2002, se relatan cuatro casos de EAG por *Balamuthia mandrillaris* atendidos en el Departamento de Neurocirugía en el Hospital Nacional de Pediatría Dr. JP Garrahan de Buenos Aires, diagnosticados por estudios histopatológicos (Galarza et al., 2002). También en 2002, se hace referencia a los mismos casos, pero en otra publicación (Scrigni et al., 2002) mencionando que fueron tipificados por Visvesvara el CDC. En 2010, en el 14th International Congress on Infectious Diseases (ICID), se presenta un caso de encefalitis de un niño argentino con sintomatología compatible con una encefalitis por AVL a su regreso de Perú, pero sin que se haya podido demostrar su etiología (Mora et al., 2010). En 2013, en el 31st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, presentaron un caso fatal de un niño del Norte de Argentina, diagnosticado en el CDC y provocado por *B. mandrillaris* (Berberian et al., 2013). Otro caso de *Balamuthia* sp., fue reportado informalmente durante el VI Congreso Argentino de Parasitología (VI CAP) en Bahía Blanca, en 2012 por sus familiares. Se trató de un niño de 23 meses, diagnóstico confirmado por Visvesvara en el CDC, sin que quedara claro el lugar y origen de la infección (com. pers., Pazos, 2012). En 2017, se presenta el primer caso de MEAP provocado por *Naegleria fowleri* (Campana et al., 2017; Marzano et al., 2017) y el primer aislamiento en aguas de la provincia de Buenos Aires (Randazzo et al., 2017). También existen comunicaciones sobre queratitis provocadas por *Acanthamoeba* sp. (D'Alessandro y Rossetti, 2007; Costamagna et al., 2010, 2015; Gertiser et al., 2010 a; Menghi et al., 2012; Apestey et al., 2017; Rojas et

al., 2017).

Con referencia a publicaciones en revistas con referato, nacionales o internacionales e indexadas en todo el mundo, tomando como fuente la base de datos PubMed y utilizando como palabras claves: Amebas de vida libre y/o free living amoebae (AVL), *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia* y *Balamuthia*, en el período que va desde 1913 (fecha en la que aparece la primera cita) hasta la actualidad (agosto de 2018), el total de publicaciones en 105 años fue de 6219 (Tabla 2). En dicha tabla, se puede observar cómo fue creciendo la cantidad de comunicaciones sobre estos protozoos, probablemente debido a un mayor conocimiento de las patologías producidos por ellos en el hombre, especialmente *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Si analizamos publicaciones con las mismas palabras claves, tomando como fuentes: PubMed, Scielo.org.ar y SIIC base de datos, podemos observar que, en Argentina, solo hubo once, de las cuales siete corresponden al grupo de trabajo del autor de esta publicación: dos en la Revista Argentina de Microbiología; dos en Salud (i) Ciencia; dos en Acta Bioquímica Latinoamericana y una en la Revista Argentina de Parasitología. A estas comunicaciones hay que sumar la de Taratuto et al. (1991), la de D'Alessandro et al. (2007) presentando el primer caso reconocido, en Argentina, de queratitis por *Acanthamoeba* asociado al uso de la solución de limpieza y conservación de lentes de contacto, la de Menghi et al. (2012) con un caso de queratitis no relacionada con el uso de lentes de contacto, la de Casero et al. (2017) con once casos de queratitis por *Acanthamoeba*, ocurridos entre 2000 y 2016 en pacientes con patología corneal, en el Hospital de Clínicas de Córdoba. A estas publicaciones se deben agregar cuatro más que no figuran en las bases de datos mencionadas: Galarza et al. (2002); Scrigni et al. (2002); Mora et al. (2010) y Berberian et al. (2013).

Géneros y especies involucrados

Acanthamoeba spp.

Con referencia a la presencia ambiental de *Acanthamoeba* spp., en Argentina se estudiaron, en la ciudad de Bahía Blanca (primavera de 2007 a invierno de 2008) 87 muestras de siete piscinas cubiertas, aislándose *Acanthamoeba* spp., en el 71% de ellas, en algún momento del estudio. En tanques de agua domiciliarios, de un total de 14 muestras, el 28,6% arrojó resultados positivos para este protozoo, no obstante, corresponde señalar que en muestras tomadas en los mismos domicilios, pero de agua proveniente de grifos que no pasaba por los tanques, por estar conectados directamente a la red de agua municipal, fueron todos negativos. Esto demostró que la contaminación era de los tanques de agua y no del agua de red que ingresaba al domicilio (Gertiser,

2015). Las muestras del arroyo que cruza toda la ciudad, el 100% fueron positivas (Gertiser et al., 2010 a). También fue aislada de ríos de Salta, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santiago del Estero, Mendoza, Córdoba, Río Negro y Neuquén (Gertiser, 2015).

Dentro de la patología corneal infecciosa y especialmente en pacientes usuarios de lentes de contacto (ULC) o con alguna micro lesión en la córnea, *Acanthamoeba* spp., se comporta como un patógeno importante. Estas micro abrasiones serían la puerta de ingreso del protozoo, mediado por la presencia de una proteína ligada a manosa que exuda la córnea y le permite a esta AVL sobrevivir e ingresar para, literalmente, destruir y digerir la córnea del paciente. En Bahía Blanca, se aisló y documentó un caso de queratitis por *Acanthamoeba* (QA) (Gertiser et al., 2010 b) aunque comunicaciones personales indican que al menos hubo, en los últimos cinco años, más de seis casos no publicados.

Este protozoo produce úlcera corneal subepitelial y absceso que compromete la superficie y espesor de la córnea. Luego del tratamiento local suele ser necesario, con posterioridad (dos años aproximadamente) un trasplante de córnea (Nagington et al., 1974).

En nuestro medio se desconoce la verdadera prevalencia de este microorganismo como agente productor de queratitis infecciosa (QI). No obstante, Apestey et al. (2017) estudiaron la frecuencia de QA sobre 514 pacientes ULC, con QI durante un periodo de ocho años (2008-2015) que consultaron en el Hospital Oftalmológico Santa Lucía y en un consultorio oftalmológico privado en la ciudad autónoma de Buenos Aires, demostrando que 143 (27,82%) fueron casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. En otro estudio epidemiológico, realizado en la ciudad de Córdoba, por Casero et al. (2017) sobre un total de 739 pacientes con patología corneal, en once casos (1,5%) se aisló *Acanthamoeba* (T4), que se suman al primer caso de D'Alessandro en 2007, a los de Menghi et al. en Buenos Aires (2012) y al de Gertiser et al. en Bahía Blanca (2010 b). La diferencia de frecuencias encontradas entre Casero et al. (2017) y Apestey et al. (2017), probablemente se pueden atribuir al tipo de muestra analizada (biopsia o raspado de córnea).

Con referencia a EAG por *Acanthamoeba*, solo existieron comunicaciones orales personales, que en el último año fueron tres, ninguna documentada ni publicada. Una de ellas, en 2017 en la Provincia de Buenos Aires, donde la paciente evolucionó favorablemente luego de que se le extirpó un tumor en el cerebro y se aislara *Acanthamoeba* (T4). Fue tratada con Miltefosina (com. pers. Esposto y Magistrello) con la genotipificación realizada por Costamagna y Rojas (no publicada), siguiendo la técnica de Schroeder et al. (2001). No existen reportes en Argentina de acanthamoebosis cutánea.

Tabla 2. Publicaciones sobre especies de *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia*, *Balamuthia* y Amebas de Vida Libre entre 1913 y 2018 a nivel mundial*.

Año	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Sappinia</i>	<i>Balamuthia</i>	AVL
2018	132	32	1	7	28
2017	214	44	3	15	7
2016	2	49	3	16	49
2015	188	47	2	25	59
2014	207	4	2	18	75
2013	204	43	2	17	41
2012	161	32	2	8	38
2011	145	33	1	16	39
2010	174	32	2	12	37
2009	163	27	6	11	35
2008	137	26	0	12	26
2007	152	3	2	16	24
2006	143	25	0	13	22
2005	116	24	1	7	24
2004	131	31	2	11	2
2003	103	27	1	8	1
2002	96	2	1	5	0
2001	94	14	1	4	13
2000	83	9	0	3	17
1999	87	11	0	4	9
1998	113	22	0	4	12
1997	11	21	0	1	1
1996	81	15	0	3	7
1995	85	15	0	1	8
1994	91	19	0	3	12
1993	97	3	0	1	6
1992	76	2	0	0	8
1991	107	2	0	0	5
1990	79	22	0	0	8
1989	78	31	0	0	7
1988	63	24	0	0	13
1987	62	3	0	0	9
1986	5	22	0	0	7
1985	42	23	0	0	7
1984	47	28	0	0	5
1983	31	32	0	0	6
1982	34	31	0	0	5
1981	35	19	0	0	7
1980	4	28	0	0	6
1979	25	28	0	0	12
1978	3	25	0	0	9
1977	23	33	0	0	5
1976	27	17	0	0	8
1975	23	18	0	0	4
1974	24	24	0	0	3
1973	2	7	0	0	9
1972	11	7	0	0	3
1971	16	14	0	0	4
1970	8	9	0	0	2
1969	16	7	0	0	6
1968	6	6	0	0	3
1967	4	3	0	0	3
1966	6	2	0	0	1

Continúa

Año	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Sappinia</i>	<i>Balamuthia</i>	AVL
1965	4	0	0	0	4
1964	5	0	0	0	2
1963	1	4	0	0	1
1962	2	0	0	0	1
1961	4	0	0	0	0
1960	3	0	0	0	1
1959	4	0	0	0	0
1958	1	3	0	0	0
1957	0	0	0	0	1
1956	0	0	0	0	1
1950	0	0	0	0	1
1947	0	1	0	0	
1913	0	0	0	0	1
Total 105 años	4091	1085	32	241	770

*Fuente: PubMed

***Naegleria* spp.**

Naegleria spp. prolifera en aguas dulces y cálidas, con temperatura ambiente mayor a 30 °C y las cepas patógenas pueden crecer entre los 40 y 46 °C (Grace *et al.*, 2015).

En Argentina, en febrero del 2017, con temperaturas óptimas para el desarrollo de este ameboflagelado, se produjo un caso fatal de MEAP en un niño en la provincia de Buenos Aires por *Naegleria fowleri* (Campana *et al.*, 2017; Marzano *et al.*, 2017). Sobre el mecanismo de infección que generó la meningoencefalitis, probablemente haya sido por inhalación de agua con *N. fowleri*, ya que el niño había estado bañándose y sumergiéndose bruscamente en la Laguna Mar Chiquita, próxima a la localidad de Vedia en los días previos al comienzo de sintomatología meníngea. Las amebas, de acuerdo con lo que se conoce respecto de la vía de infección (Jarolim *et al.*, 2000; Trabelsi *et al.*, 2012), probablemente penetraron por la mucosa nasal y placa cribiforme, viajando a lo largo del nervio olfatorio, que termina en el bulbo olfatorio, en el espacio subaracnoideo, muy vascularizado y rodeado de líquido cefalorraquídeo y a través de él, se diseminaron al resto del sistema nervioso central. La virulencia del protozoo y el daño secundario por la respuesta inmune del hospedador produjeron edema cerebral y daño neurológico, lo que llevó al coma y muerte del paciente (Marciano Cabral y Cabral, 2007). En este caso, el diagnóstico presuntivo fue realizado inmediatamente después de que el bioquímico interviniente observó amebas en el sedimento del líquido cefalorraquídeo (LCR) y se comunicó con el autor de este manuscrito (Campana *et al.*, 2017). Rápidamente se realizó el diagnóstico presuntivo de *Naegleria* sp., y se administró el tratamiento

correspondiente (Schuster *et al.*, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007). Luego se envió el LCR para cultivo a la cátedra de Parasitología Clínica de la Universidad Nacional del Sur, donde en 48 hs. se confirmó que se trataba de *Naegleria* sp., pero, a pesar de los esfuerzos por realizar un rápido diagnóstico y pronto tratamiento, el niño falleció. *Postmortem*, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se tipificó el ameboflagelado aislado como *N. fowleri*. Con posterioridad, se obtuvo muestra de agua de la laguna de Mar Chiquita del lugar aproximado donde el niño estuvo sumergiéndose en el agua y se aisló *N. fowleri*, con lo cual finalmente quedó confirmada la fuente de infección (Randazzo *et al.*, 2017). En la actualidad, letreros advierten sobre la peligrosidad de bañarse en el sector, especialmente al sumergir la cabeza en el agua, ya que, como se indicó, el protozoo ingresa por las fosas nasales.

La patogenicidad de *N. fowleri* se debe a la destrucción de los tejidos que provoca para alimentarse (de allí el nombre vulgar con el que se la conoce: “ameba come cerebros”), liberando moléculas citolíticas, incluyendo hidrolasas ácidas, fosfolipasas, neuraminidasas y enzimas que provocan la destrucción de las células cerebrales del hospedador y del nervio (De Jonckheere, 2011). Uno de los mayores peligros para contraer la infección son el tiempo de permanencia del bañista en el agua y las formas de sumergirse en la misma, sin oprimir fosas nasales ya sea con los dedos o con tapones, con el objeto de impedir el ingreso a presión del agua contaminada (Grace *et al.*, 2015). *Naegleria* es sensible a la cloración del agua, situación que no ocurre con *Acanthamoeba*, que requiere de 60 ppm de cloro para ser eliminada (Costamagna *et al.*, 2010).

***Balamuthia* spp.**

Balamuthia mandrillaris es otra AVL presente en suelo y aguas. En Argentina, al igual que *N. fowleri*, podemos considerarlo un patógeno emergente, debido al aumento de temperaturas globales. Causa lesiones cutáneas, y a nivel del SNC produce EAG con desenlace fatal, al igual que *Acanthamoeba* sp., en casi todos los casos, si no es tratada rápidamente y con medicación adecuada. En algunos pacientes, las infecciones pueden aparecer en la cara o extremidades (generalmente centro-facial pero en algunas ocasiones se la ha observado en rodilla) o en el tronco, la que suele progresar a una lesión infiltrativa que puede ulcerarse. Estas lesiones primarias en piel pueden durar semanas o meses y precediendo a otros síntomas graves en SNC, con pronóstico muy grave (Cabello *et al.*, 2014).

En Argentina están documentados cuatro casos de EAG por *B. mandrillaris* diagnosticados por histopatología (Galarza *et al.*, 2002); estos mismos casos,

tipificados por Visvesvara en el CDC, son mencionados también por Scrigni *et al.* (2002). Otro caso, corresponde a un niño argentino con sintomatología compatible con una encefalitis por AVL a su regreso de Perú, pero sin que se haya demostrado dónde se infectó ni certificado que se tratara de una AVL (Mora *et al.*, 2010). Berberian *et al.* (2013), presentaron un caso fatal de un niño del Norte de Argentina, diagnosticado en el CDC como *B. mandrillaris*. Otro caso de *Balamuthia* sp. reportado informalmente por sus familiares (com. pers., Pazos, 2012), corresponde a un niño de 23 meses, diagnosticado por Visvesvara en el CDC y simultáneamente en el Instituto Malbrán, sin que quedara claro el lugar y origen de la infección. Seguramente existan más casos, pero sin comunicaciones en Congresos de la especialidad ni publicaciones indexadas.

Sappinia pedata

Sappinia pedata (antes *S. diploidea*) es una ameba lobosa que alterna el estadio de trofozoíto y el de quiste. Los trofozoítos de *Sappinia* sp., miden de 50 a 60 micras de largo por 20 a 30 micras de ancho con dos núcleos unidos, característica distintiva de este género, y locomoción monopodial. Fueron aisladas de suelo, heces de lagartos, alces, bisontes y ganado vacuno.

Fue reportada como agente etiológico de un caso de encefalitis por primera vez en el 2001, conociéndose su ultraestructura en 2003 (Walochnik *et al.*, 2010). En este único caso en humanos, el paciente desarrolló pérdida de conciencia, fotofobia, náuseas, visión borrosa, vómitos y dolor de cabeza en la región frontal durante tres días.

El cultivo se realiza a temperatura ambiente en agar no nutritivo (ANN) con bacterias, igual que para *Acanthamoeba* (Gelman *et al.*, 2001, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007).

Hasta el momento (agosto de 2018) no hay comunicaciones ni registros de casos humanos producidos por *Sappinia* sp., en Argentina.

ENDOSIMBIOTES EN AVL

Las AVL pueden comportarse como “caballos de Troya” ya que pueden albergar en su interior, endosimbiontes como bacterias y virus. Esta asociación permite al endosimbionte permanecer, resistir y diseminarse en ambientes no ideales para su crecimiento. Los microorganismos están vivos en su interior, actuando las primeras como diseminadores (vectores) de los segundos (Greub *et al.*, 2004; Khan, 2006; Marciano Cabral *et al.*, 2010). En su interior están a resguardo de agentes quimioterapéuticos, del sistema inmune del hospedador, del medio ambiente que pueda ser adverso, etc., y, además, pueden reproducirse (Drozanski, 1956; Proca-Ciobanu *et al.*,

1975; Khan, 2009). En Argentina, en diciembre de 2009 aislamos una AVL (diferente a las ya mencionadas) de la piscina cubierta de uso recreacional municipal en la ciudad de Sarmiento, Provincia de Chubut. La misma contenía en su interior un virus que fue detectado por microscopía electrónica de transmisión que se continuaba observando en subcultivos. Los estudios posteriores realizados en la cátedra de Virología de la Universidad de Buenos Aires aportaron evidencias de un virus con genoma quimérico, compatible con descripciones de los grandes virus de DNA núcleo-citoplasmáticos (López et al., 2011).

DIAGNÓSTICO

Acanthamoeba, *Naegleria* y *Sappinia* pueden ser diagnosticadas en cualquier laboratorio de Bacteriología dado que es relativamente sencillo, mientras que para *Balamuthia* se requiere cultivo de tejidos, test de inmunofluorescencia directa o PCR. Para tipificar adecuadamente todos los géneros, se deben efectuar técnicas de biología molecular desde la simple y tradicional PCR hasta otras más complejas, dependiendo hasta dónde se quiera llegar en la tipificación y si se trata de genotipos no conocidos o para investigación (Costamagna et al., 2010, 2015; Campana et al., 2017; Randazzo, 2017).

Por ser las más prevalentes, nos referiremos a *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

Cultivos

Se utilizan placas de Petri estériles, con ANN. Una vez solidificado el agar, se colocan sobre su superficie 500 microlitros de una suspensión de *Escherichia coli* en solución de Page (Page, 1967, Tabla 3) y sobre ello, 100 microlitros de la muestra, si es líquida, o trozo de tejido sin fijar.

Las placas sembradas se colocan en incubadora de laboratorio a 37 °C. A las 48 hs., se realiza la primera observación para detectar si hubo o no crecimiento. Para ello se raspa con asa bacteriológica la superficie del agar, el material extraído se suspende en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjeto y se observa al microscopio óptico, con 10 y 40 aumentos. El cultivo es considerado positivo cuando se observan trofozoítos y/o quistes morfológicamente compatibles con alguno de estos dos géneros de AVL. Cuando el resultado es negativo, la observación se repite diariamente durante 7 días. Si a los 15 días de incubación no se observó desarrollo de AVL, se descarta y se informa como negativo.

En las muestras que resulten positivas, se debe realizar el estudio morfológico y morfométrico de las cepas aisladas. Se registran, en los trofozoítos aislados, la presencia de acantópodos, seudópodos y las características del núcleo. En los quistes se observan las características de la pared y el número

Tabla 3. Composición de solución de Page.

Compuesto químico	Cantidad
NaCl	120 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4 mg
Na ₂ HPO ₄	142 mg
KH ₂ PO ₄	136 mg
H ₂ O destilada csp.	1000 ml

* Abreviada de Adl et al., 2013.

de ostiolos (Gertiser et al., 2013; Costamagna, 2018).

En caso de EAG o MEAP, la observación del LCR centrifugado a baja velocidad, sin refrigerar, permite la visualización de trofozoítos móviles al microscopio óptico. Si no se observan trofozoítos y se sospecha etiología debida a *Acanthamoeba* spp. o *Naegleria* spp., se debe cultivar el LCR en ANN cubierto con bacterias (*Escherichia coli*). Si el cultivo es positivo, se debe realizar prueba de exflagelación, para diferenciar *Naegleria* spp. de *Acanthamoeba* spp. (Siddiqui, 2016). De la misma manera se procesan otras muestras como agua de lagunas, ya que se toma una muestra de entre 100 y 200 ml, se las deja sedimentar una o dos noches, luego se descarta el sobrenadante y se siembra el sedimento.

Generalmente los diagnósticos anatomopatológicos, debido a lo agudo y agresivo del cuadro, se realizan *postmortem*, para lo cual los cortes histológicos de tejido cerebral se pueden colorear con Giemsa, Hematoxilina-Eosina, Tricómico, etc., o bien los trofozoítos pueden visualizarse por inmunofluorescencia directa. También se puede realizar cultivo de la biopsia, sobre tejido sin fijar. No es de utilidad el diagnóstico serológico, debido a que la mayoría de los pacientes fallecen rápidamente después de la infección y el sistema inmune no llega a responder. En Argentina, no se dispone de reactivos comerciales para determinar título de anticuerpos, ni tampoco para realizar inmunofluorescencia directa para AVL.

Al igual que el resto de las patologías producidas por AVL, la QA presenta una rápida evolución que requiere diagnóstico inmediato para instaurar tratamiento adecuado y evitar que el cuadro sea irreversible. Se debe recomendar a los médicos, especialmente a aquellos que realizan guardias en Centros de Salud que, frente a cualquier lesión compatible con Herpes virus o *Acanthamoeba* spp., soliciten inmediatamente cultivo, que puede realizarse en cualquier laboratorio básico de bacteriología. Para QA, la toma de muestras (raspado o biopsia de córnea) debe realizarla un médico oftalmólogo, y de

ser posible colocar directamente el material en líquido de Page con *E. coli* y remitir al laboratorio. También es recomendable, en QA, que el paciente entregue al microbiólogo los estuches de las lentes de contacto para que éste proceda a centrifugar suavemente el líquido contenido en los mismos y observar al microscopio para buscar trofozoítos y/o quistes de *Acanthamoeba* y además, sembrar el material en ANN como se describió. Muchas veces este procedimiento ya arroja resultado positivo, suficiente para que el oftalmólogo pueda tomar una decisión respecto del diagnóstico y tratamiento (Apestey et al., 2017).

Diagnosis de especies del género *Naegleria*

Se realiza la prueba de Transformación Amebo-Flagelar (TAF). Para ello cada muestra que presente desarrollo de *Acanthamoeba/Naegleria*, se debe replicar en ANN y a las 48 hs. de incubación se le agrega entre 1 y 3 ml de agua destilada estéril para bajar la concentración de nutrientes y generar a las amebas presentes un medio para que se desplacen fácilmente. A las 2, 4 y 6 hs. de incubación a 37 °C, se realizan observaciones microscópicas entre porta y cubreobjetos. Con esta prueba, si la AVL aislada corresponde al género *Naegleria*, cambiará a la forma flagelada bien visible, caso contrario se observará sólo la forma ameboide de los trofozoítos con acantópodos, correspondiente a *Acanthamoeba* spp. Además sus quistes son redondos, a diferencia de los de *Acanthamoeba* que pueden ser redondos con doble pared, rodeando a una estructura estrellada o poliédrica (Page, 1967, Costamagna, 2018).

Medios de cultivo y soluciones:

-ANN: agar-agar 1,5% en solución de Page (p/v). El medio se calienta a baño María hasta ebullición, se fracciona de acuerdo con su uso y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Se guarda en heladera a 4 °C hasta su uso.

-Cepas de *Escherichia coli*: se puede utilizar cualquier cepa aislada en Agar Levine u otro, tipificadas (es importante verificar la viabilidad de las bacterias a utilizar) (Guzmán-Fierros et al., 2008; Lares-Jiménez y Lares-Villa, 2009).

Las técnicas de biología molecular (PCR) son herramientas útiles para el diagnóstico, pero ello requiere una movilización rápida hacia centros donde esté desarrollada y con los reactivos y cebadores adecuados, lo que no siempre es posible. Una PCR permite diagnosticar género y especie de *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*, mientras que el cultivo solo género, en la mayoría de los casos. Es importante remarcar la importancia de la observación de los trofozoítos en LCR, lo que habitualmente debe realizar el bioquímico o microbiólogo de guardia hospitalaria, ya que el

diagnóstico presuntivo es fundamental para instaurar el tratamiento lo más rápido posible. El aislamiento posterior en ANN para confirmar y si fuere posible una PCR, solo completarían el diagnóstico, pero muy probablemente sean de escaso valor ya que el paciente, si no respondió al tratamiento, seguramente habrá fallecido.

TRATAMIENTO

No existe terapia totalmente efectiva para el tratamiento de estas patologías, por lo cual la mayoría de los esquemas terapéuticos son empíricos y perfectibles.

La MEAP y EAG tienen una alta tasa de mortalidad (aproximadamente 95%). *Naegleria fowleri* es muy sensible a la anfotericina B; el diagnóstico precoz y el tratamiento agresivo pueden salvar vidas en casos ocasionales. Otras infecciones causadas por *Acanthamoeba* y *Balamuthia* generalmente se tratan con una combinación de medicamentos que incluyen azoles (clotrimazol, miconazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol), isotionato de pentamidina, 5-fluorocitosina y sulfadiazina. No se debe suponer que único medicamento es eficaz contra todas las amebas, sino que una combinación de medicamentos es lo que garantiza que al menos uno sea eficaz. El tratamiento debe ser prolongado, ya que existe la posibilidad de que los quistes presentes en las infecciones por *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, puedan provocar una recaída luego de un tratamiento inicialmente efectivo (Schuster et al., 2006).

El resultado depende de qué tan temprano se inicie el tratamiento, el estado inmunitario del paciente y la virulencia de la AVL (Newton et al., 2013). *Acanthamoeba* es resistente a la mayoría de los antimicrobianos y a ello se le suma la necesidad de que deben atravesar la barrera hematoencefálica, en afecciones del SNC. Algunos casos de patología por *B. mandrillaris* fueron tratados combinando esteroides, antibacterianos, antifúngicos y antivirales. Existe registro de tres pacientes que sobrevivieron a la infección tratados con isotionato de pentamidina, sulfadiazina, claritromicina y fluconazol más flucitosina (5-fluorocitosina) y, al igual que con otras AVL, la rapidez diagnóstica y el adecuado tratamiento son fundamentales para una evolución favorable del paciente (Visvesvara et al., 2007). La miltefosina, utilizada para Leishmaniosis, pareciera ser muy efectiva, combinada con las drogas mencionadas y abre nuevas perspectivas para tratamiento de AVL, razón por la cual el diagnóstico precoz mejoraría la posibilidad de sobrevivida de los pacientes (Walochnik et al., 2002; Visvesvara et al., 2007; Polat et al., 2012). Para *Naegleria*, en fases muy tempranas de la enfermedad, se suele usar anfotericina B en el tratamiento de la MEAP, con resultados positivos

en varios pacientes, vía intratecal o intravenosa, y se puede combinar con miconazol, rifampicina o sulfadiazina y miltefosina. Para tratar AC se utilizan aplicaciones tópicas de itraconazol, 5-fluorocitosina, pentamidina, ketoconazol y clorohexamidina (Visvesvara *et al.*, 2007).

La QA es tratada con aplicaciones tópicas de biguanidas como polihexametilenbiguanida (PHMB) 0,02% o clorhexidina dicluconato 0,02%, combinadas con diamidinas; antibióticos para las infecciones bacterianas asociadas, analgésicos y antiinflamatorios esteroideos. La terapia inicial requiere aplicaciones cada hora durante las 24 horas, por dos a tres días. En los tres o cuatro días siguientes se aplica solo durante el día y el resto del primer mes, cada dos horas, seguidas de seis aplicaciones por 35 días durante los siguientes meses hasta uno o dos años. La PHMB debe ser preparada por un farmacéutico ya que no hay presentaciones comerciales en Argentina, situación que muchas veces genera ansiedad y preocupación al paciente ya que no todas las farmacias lo preparan (en Argentina solo una, en Ciudad Autónoma de Buenos Aires) (Visvesvara *et al.*, 2007; Gertiser *et al.*, 2010).

PREVENCIÓN de QA

En los últimos treinta años, aumentó la incidencia de QA de manera importante. Ser usuario de estas lentes requiere tomar una serie de precauciones para evitar la contaminación de los estuches con *Acanthamoeba*, razón por la cual los líquidos utilizados para su conservación contienen biguanidas y requieren que el usuario mantenga, durante varias horas, las lentes en contacto con el líquido. Con referencia a *Naegleria* ya fue señalado en el texto.

LITERATURA CITADA

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowse S, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampel V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 60: 429-507.
- Apestey N, Brunzini MA, Costamagna SR. 2017. Queratitis por *Acanthamoeba* spp., en ULC. XIV Congreso Nacional Bioquímico CUBRA, Bariloche, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Supl. 1*: 164-165.
- Baig AM. 2015. Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an 'inside job' done by the host immune response? *Acta Tropica* 148: 72-76.
- Berberian G, Rosanova MT, Mudrick G, Finkelievich J, Rodríguez S, Lubieniecki F, Luna D, Visvesvara G, Paulin P. 2013. Case report: Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* in children. 31st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. <http://w3.kenes-group.com/apps/esp2013/abstracts/pdf/785.pdf>. Último acceso 20 de agosto de 2017.
- Cabello-Vílchez AM, Rodríguez Zaragoza J, Piñero Show E, Lorenzo-Morales J. 2014. *Balamuthia mandrillaris* in South America: An emerging potential hidden pathogen in Perú. *Experimental Parasitology* 145: S10-S19.
- Campana J, Machain M, Basabe N, Allende Dave V, Romano L, Visciarelli E, Randazzo V, Costamagna SR. 2017. Primer caso de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) por *Naegleria fowleri*, en Argentina. *Revista Parasitología Latinoamericana* 66: 252-253.
- Carter RF. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of Pathology* 100: 217-244.
- Casero RD, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teheranc A, Herrera G, Ramírez J D. 2017. Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 54: 170-175.
- Costamagna SR. 2018. ¿Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) por *Naegleria fowleri*, emergente en Argentina? Boletín electrónico de la Asociación Argentina de Microbiología 220: 26-35. Disponible en: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Boletin-220-VFF.pdf>. Último acceso 12 de julio de 2018.
- Costamagna SR, Gertiser M, Visciarelli, Basabe N, Felice V. 2010. *Acanthamoeba* spp.: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre. *Salud (i) Ciencia* 17: 821-826.
- Costamagna SR, Gertiser L, Visciarelli E, Basabe N, Randazzo V, Lucchi L. 2015. Inputs for diagnosing *Acanthamoeba* spp. infections. *Salud (i) Ciencia* 21: 648-650.
- Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science* 127: 1506-1507.
- Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK, Minner JR. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *American Journal of Pathology* 35: 185-197.
- D'Alessandro LP, Rossetti SB. 2007. Queratitis por *Acanthamoeba* en un paciente usuario de solución multipropósito de limpieza de lentes de contacto: Primer Caso en Argentina. *Oftalmología Clínica y Experimental* 1: 29-31.
- De Jonckheere JF. 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1520-1528.
- Drozanski W. 1956. Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiologica Polonica* 5: 315-317.
- Fowler M, Carter R F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: A preliminary

- report. *British Medical Journal* 2: 740-743.
- Fuerst PA, Booton GC, Crary M. 2015. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 69-84.
- Galarza M, Cuccia V, Sosa FP, Monges JA. 2002. Pediatric granulomatous cerebral amebiasis: A delayed diagnosis. *Pediatric Neurology* 26:153-156.
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Bokowski J, Chaljub G, Nauta HW, Visvesvara GS. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* 285: 2450-2541.
- Gelman BB, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf SJ, Nauta HW, Visvesvara GS. 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amoebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 62: 990-998.
- Gertiser ML. 2015. Aspectos biológicos y epidemiológicos de Amebas de Vida Libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca (Argentina). 206 pp. Disponible en: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2567>. Último acceso: 11 de julio de 2018.
- Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Luján H, Occhionero M, Paniccia L, Visciarelli E, Costamagna SR. 2010 a. *Acanthamoeba* sp. keratitis: first case confirmed by isolation and molecular typification in Bahía Blanca, Buenos Aires Province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 122-125.
- Gertiser ML, Visciarelli E, Basabe N, Pérez MJ, Costamagna SR. 2010 b. Aislamiento de *Acanthamoeba* spp. de piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 44: 697-703.
- Gertiser ML, Visciarelli E, Costamagna SR. 2013. Ultraestructura de *Acanthamoeba* sp. (Amebozoa, Acanthamoebidae). *Revista Argentina de Parasitología* 1: 32-44.
- Grace E, Asbill S, Virga K. 2015. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59: 6677-6681.
- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 413-433.
- Guzmán-Fierros E, De Jonckheere JF, Lares-Villa F. 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 1-5.
- Jarolim KL, McCosh JK, Howard MJ, John DT. 2000. A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amoebic meningoencephalitis in mice. *Journal of Parasitology* 86: 50-55.
- Kenne M. 1971. The Micro-Kolmer complement fixation test in routine screening for soil amoeba infection. *Health Laboratory Science* 8: 5-10.
- Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 564-595.
- Khan NA. 2009. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. 1ra Ed. Caister Academic Press, Nottingham, United Kingdom. 356 pp.
- Khan NA. 2015. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. 2da Ed. Caister Academic Press, Nottingham, United Kingdom. 290 pp.
- Lares-Jiménez LF, Lares-Villa F. 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 5: 161-167.
- López JL, Gertiser ML, Jensen O, Visciarelli E, Costamagna SR. 2011. P236. Presencia de un virus quimérico en ameba de vida libre (AVL) aislada de aguas recreativas. X Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 42 (Supl.1): 118-119.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 273-307.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. 2007. The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 51: 243-259.
- Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro ES. 2010. Free living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of Water Health* 8: 71-82.
- Martínez JM, Visvesvara GS, Chandler FW. 1997. Free-Living Amoebic Infections. En: Connors DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack E (Eds). *Pathology of Infectious Diseases*, Vol II. Editorial Appleton & Lange. Stamford, Connecticut, United States of America: 1163-1176.
- Marzano L, Campana J, Romano ML, Allende M, Giammaría M, Eceizabarrena MI, Gutiérrez F, Frino S, Casati D, Saretto C, Serafini A, Martin G, Rosso ME, Dematteis V, Goyeneche R, Giagante E, Machain M, Cuitiño M, García Rubio C. 2017. Meningoencefalitis amebiana primaria: reporte de un caso en el noroeste de la provincia de Buenos Aires. VI Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Sociedad Argentina de Infectología Pediátrica. Buenos Aires, Argentina. Libro de Resúmenes, disponible en: <http://www.sadip.org.ar/img/LIBRO-DE-RESUMENES-SADIP-2017.pdf>
- Menghi C, Caride C, Gatta C. 2012. *Acanthamoeba* sp.: un caso de queratitis no relacionada con el uso de lentes de contacto. *Revista Argentina de Microbiología* 44: 275-277.
- Mora CA, Orellana N, Schteinschnaider A, Arakaki N, Del Castillo M. 2010. Free living amoebae encephalitis infection in a child who travelled to Perú. 14th International Congress on Infectious Diseases (ICID). *International Journal of Infectious Diseases* 14 (Supl.1): 41.
- Moussa M, De Jonckheere JF, Guerlotté J, Richard V,

- Bastaraud A, Romana M, Talarmin A. 2013. Survey of *Naegleria fowleri* in geothermal recreational waters of Guadeloupe (French West Indies). *PLoS One* 8: e54414-15.
- Nagington J, Watson PG, Playfair TJ. 1974. Amoebic infection of the eye. *The Lancet* 2: 1537-1540.
- Newton C, Preux P, Singhi P. 2013. Pediatric Neurology Part II. En: Dulac O, Lassonde M, Sarnat HB. (Eds.). *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier. Atlanta, United States of America: 1139-1152.
- Oddó D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatomo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología* 23: 200-214.
- Ong T, Khan NA, Siddiqui R. 2017. Brain-Eating Amoebae: Predilection Sites in the Brain and Disease Outcome. *Journal of Clinical Microbiology* 55: 1989-1997.
- Page FC. 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *The Journal of Protozoology* 14: 709-724.
- Patras D, Andujar J. 1966. Meningoencephalitis due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). *American Journal of Clinical Pathology* 46: 226-233.
- Proca-Ciobanu M, Lupascu GH, Petrovici A, Ionescu MD. 1975. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *International Journal for Parasitology* 5: 49-56.
- Pushkarew BM. 1913. Über die Verbreitung der Süßwasser protozoen durch die Luft. *Archives Protistent* 23: 323-362.
- Pussard M. 1966. Le genere *Acanthamoeba*, Volkonsky 1931 (*Hartmannellidae*-Amoebida). *Protistologica* 2: 71-93.
- Randazzo V, Lucchi L, Costamagna S. 2017. *Naegleria fowleri*, un emergente en Argentina. *Parasitología Latinoamericana* 66: 432-433.
- Rojas M, Rodríguez Fermepín M, Gracia Martínez F, Costamagna SR. 2017. Presencia de *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 227-234.
- Sandí E, Moreira LR. 2014. Amebas de vida libre como agentes de encefalitis en el ser humano. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica* 3: 5-8.
- Schroeder JM, Booton JC, Hay J, Niszli IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. 2001. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1903-1911.
- Schuster FL, Guglielmo BJ, Visvesvara GS. 2006. In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: 121-126.
- Scrigni A, Quevedo S, Gamba L, Lubieniecki F, Taratuto AL, Pésico S, Rodríguez S. 2002. Encefalitis granulomatosa amebiana causada por *Balamuthia mandrillaris*. Presentación de cuatro casos en pediatría. *Medicina Infantil IX*: 205 -210.
- Siddiqui R, Ali IK, Cope J, Khan N. 2016. Brain-Eating Amoebae. Biology and Pathogenesis of *Naegleria fowleri*. 1ra Ed. Caister Academic Press, Nottingham, United Kingdom. 252 pp.
- Singh BN. 1950. Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 236: 405-461.
- Stehr-Green JK, Bailey TM, Brandt FH, Carr JH, Bond W, Visvesvara G. 1987. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers: a case-control study. *JAMA* 258: 57-60.
- Taratuto AL, Monges J, Acefe JC. 1991. Leptomyxid amoeba encephalitis: report of the first case in Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85: 77.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathology and Medical Biology* 160: 399-405.
- Valencia Viera LA. 2012. Estudio de AVL en verduras crudas, en Tenerife, Islas Canarias, España. Tesis de Maestría, Universidad de La Laguna, Islas Canarias, España 70 pp. Disponible en: <https://es.calameo.com/read/00200323823e43e010e74>. Último acceso 4 de julio de 2018.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50: 1-26.
- Volkonsky A. 1931. *Acanthamoeba*. *Archives de zoologie expérimentale et generale* 72: 317-338.
- Walochnik J, Duchêne M, Seifert K. 2002. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 695-701.
- Walochnik J, Wylezich C, Michel R. 2010. The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Experimental Parasitology* 126: 4-13.

Recibido: 17 de julio de 2018

Aceptado: 4 de septiembre de 2018
