



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

Informe final de investigación previo a la obtención del título de:
LICENCIADA EN CIENCIAS DE LA SALUD EN LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO

TRABAJO DE TITULACIÓN:

Diagnóstico de laboratorio clínico en la infección humana por amebas de vida libre

Autora:

Jessica Maribel Tenelema Tenelema

Tutora:

PhD. Luisa Carolina González Ramírez

Riobamba - Ecuador

2020

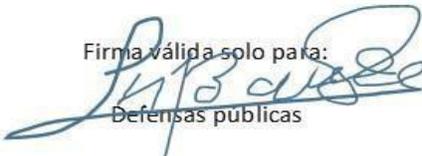
REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación bibliográfica de título: **“Diagnóstico de laboratorio clínico en la infección humana por amebas de vida libre”**. Presentado por Jessica Maribel Tenelema Tenelema, dirigida por PhD. Luisa Carolina González Ramírez, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH.

Para constancia de lo expuesto firman:

MsC. Mercedes Balladares

Presidente del Tribunal

Firma válida solo para:

Defensas publicas

.....

MsC. Yisela Ramos

Miembro del Tribunal

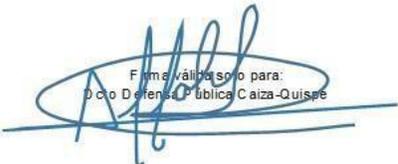
Firma válida solo para:

Titulación especial

.....

MsC. Félix Falconi

Miembro del Tribunal

Firma válida solo para:

Dpto Defensa Pública Caiza-Quisque

.....

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, **Luisa Carolina González Ramírez**, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: **Diagnóstico de laboratorio clínico en la infección humana por amebas de vida libre**, propuesto por la **Srta. Jessica Maribel Tenelema Tenelema**, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 02 de diciembre de 2020



.....

Luisa Carolina González Ramírez

Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de graduación, corresponde exclusivamente a Jessica Maribel Tenelema Tenelema con cédula de identidad: 0250187267 y a la Tutora del Proyecto de Investigación en modalidad de Revisión Bibliográfica PhD. Luisa Carolina González Ramírez y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo”



.....
Jessica Maribel Tenelema Tenelema

025018726-7

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por derramar tantas bendiciones, salud, valor e infinito amor y fortaleza en cada adversidad que se presentó a lo largo de la carrera y poner en mi camino personas maravillosas que han sido claves para poder alcanzar esta meta. A mi tutora PhD. Luisa Carolina González Ramírez, gracias por su orientación, su paciencia, enseñanza, apoyo incondicional y valioso aporte para llegar al objetivo.

Agradezco a la Universidad Nacional de Chimborazo, quien me abrió las puertas para alcanzar un logro más en mi vida, de manera especial a la Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, ya que, en sus aulas, fue posible la formación profesional, quien se ha convertido en mi segundo hogar, que más que una profesión se ha convertido en mi vocación, a mis docentes por impartir sus conocimientos durante la formación académica, formando profesionales con ética.

Jessica Maribel Tenelema Tenelema

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación dedico, a mi madre Herlinda Tenelema Alulema, por ser el pilar fundamental en mi vida, mi gran inspiración, mi mayor motivo, quien con su amor, paciencia y esfuerzo me ha permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí, el ejemplo de esfuerzo y valentía, por su sacrificio su comprensión y sobre todo por ser una madre ejemplar, a mis hermanas Sorayda, Elsa y mi hermano Alex por su cariño y apoyo incondicional, mi abuelita por ser el ángel que guía cada uno de mis pasos y mi fuente de inspiración.

Jessica Maribel Tenelema Tenelema

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO I	6
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Amebas de Vida Libre	6
1.2. Ciclo de vida	7
1.3. Clasificación taxonómica.....	8
1.4. Amebas de vida libre patógenas.....	8
1.4.1. <i>Acanthamoeba</i>	8
1.4.2. <i>Naegleria</i>	9
1.4.3. <i>Balamuthia</i>	10
1.4.4. <i>Sappinia</i>	11
1.5. Patologías más frecuentes causadas por las AVL.....	11
1.5.1. Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)	12
1.5.2. Queratitis amebiana (QA).....	12
1.5.4. Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP).....	14

CAPÍTULO II.....	15
2. METODOLOGÍA.....	15
2.1. Enfoque.....	15
2.2. Tipo de estudio.....	15
2.3. Nivel de Alcance.....	15
2.4. Diseño.....	16
2.5. Población.....	16
2.6. Muestra.....	16
2.7. Estrategia de búsqueda.....	17
2.8. VARIABLES DE ESTUDIO.....	18
2.10. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	20
CAPÍTULO III.....	23
3. DESARROLLO.....	23
3.1. Prevalencia de la infección humana causada por AVL.....	23
3.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	25
3.2.1. Diagnóstico Parasitológico.....	25
3.2.2. Cultivo.....	34
3.2.3. Diagnostico Inmunológico.....	36
3.2.4. Diagnóstico Molecular.....	37
3.2.5. Algoritmo de diagnóstico con los diferentes métodos y técnicas utilizados, para identificación de AVL en patología humana.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variable.....	18
Tabla 2. Publicaciones a nivel mundial de detección de géneros <i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Balamuthia</i> , y <i>Sappinia</i> , durante el periodo 2000-2018.	23
Tabla 3. Características morfológicas y biológicas diferenciales entre trofozoítos y quistes de <i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Balamuthia</i> y <i>Sappinia</i>	26
Tabla 4. Análisis del LCR y sus semejanzas con otras infecciones.	30
Tabla 5. Preparación de solución Page.	35
Tabla 6. Coincidencias de autores, en la elección de técnicas de diagnóstico empleadas en la identificación de AVL, asociadas a patologías en humanos.	42
Tabla 7. Técnicas utilizadas en el de diagnóstico de amebas de vida libre (AVL), publicadas durante los últimos 5 años.	46
Ilustración 1. Algoritmos de búsqueda bibliográfica de la literatura: artículos identificados en bases de datos, seleccionados para integrar la revisión.	21

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) están distribuidas en el medioambiente, son capaces de infectar al humano, produciendo meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis granulomatosa amebiana, queratitis y amebiosis cutánea. La investigación es cualitativa, transversal, exploratoria y documental. Tiene como objetivo, recopilar información relacionada con el diagnóstico de AVL, a partir de la búsqueda y análisis bibliográfico de documentos contenidos en bases de datos biomédicas: Scielo, Pubmed, Medline, Lilacs, Scopus, BVS, Dialnet y Google Académico. De las cuales, se tomó como población de estudio 85 documentos que fueron depurados hasta obtener una muestra de 41, después de la filtración bajo los criterios de inclusión y exclusión. Los géneros más frecuentes son *Acanthamoeba* y *Naegleria fowleri*, seguido de *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia*. Las técnicas de diagnóstico empleadas han sido: Examen Directo, tinciones con May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina, PAS, Fluorescente de Naranja de Acridina y Calco Flúor White y cultivo con medios de agar no nutritivo. Además, se describe el uso de Inmunofluorescencia Directa e Indirecta, Inmunoelectroforesis y Citometría de Flujo en el inmunodiagnóstico, aunque muestran una baja sensibilidad. Finalmente, se incluye la PCR como técnica de elección en el diagnóstico molecular, siendo considerada como la más apropiada por su gran sensibilidad, especificidad y rapidez, teniendo como ventaja el requerimiento de mínimas cantidades de muestra. Se concluye la importancia de incorporar la detección de AVL en casos sospechosos, para contribuir con el diagnóstico oportuno, haciendo posible la aplicación del tratamiento adecuado, que favorezca en la disminución de la mortalidad de los pacientes.

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

ABSTRACT

Free-living amoebas (FLA) are distributed in the environment. They can infect humans, producing primary amoebic meningoencephalitis, amoebic granulomatous encephalitis, keratitis, and cutaneous amebiasis. The research is qualitative, transversal, its objective exploratory, and documentary. Aims to collect information related to the diagnosis of (FLA) from the search and bibliographic analysis of documents contained in biomedical databases: Scielo, Pubmed, Medline, Lilacs, Scopus, BVS, Dialnet, and Google Scholar. Eighty-five documents were deputed until getting a sample of 41, after filtration under the inclusion and exclusion criteria. The most frequent genera are *Acanthamoeba* and *Naegleria fowleri*, followed by *Balamuthia mandrillaris* and *Sappinia*. The diagnostic techniques used were: Direct Examination, stains with May Grunwald-Giemsa, Hematoxylin-Eosin, PAS, Acridine Orange Fluorescent and White Fluorine Calco, and culture with not nutritious agar media.

Besides, use is described of Direct and Indirect Immunofluorescence, Immunoelectrophoresis and Flow Cytometry in immunodiagnosis, although they show low sensitivity. Finally, PCR is included as the choice technique in molecular diagnosis, being considered the most appropriate due to its excellent sensitivity, specificity, and speed, having the advantage of requiring minimal sample quantities. The importance of incorporating the detection of FLA in suspected cases is concluded, to contribute to the timely diagnosis, making possible the application of a proper treatment, which favors reducing patients' mortality.

Keywords: Free-living amoebas, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* diagnosis.

Reviewed by:

Lic. Yesenia Merino Uquillas

ENGLISH PROFESSOR

C.I. 0603819871

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL), son protozoos que se caracterizan por su ubicuidad y capacidad anfizoica, viven en el medio ambiente, tolerando condiciones extremas, se han aislado de cuerpos hídricos naturales y artificiales como: aguas termales, lagos, ríos, charcos, aguas residuales, depósitos domésticos, agua de piscinas, acuarios, canales de irrigación y recipientes de lentes de contacto. Se pueden encontrar cualquiera de sus estadios morfológicos: trofozoíto (forma vegetativa que causa daño al hospedador) y quiste, siendo formas de resistencia, que pueden permanecer viables durante largos periodos en el medioambiente, por lo que la transmisión hídrica juega un papel fundamental en su epidemiología.

Sin olvidar que tienen un extenso hábitat en la naturaleza, pudiéndose encontrar en polvo, suelo y aire. Además, se debe tener en cuenta el riesgo epidemiológico dentro de los centros de atención sanitaria, en vista de que también han sido encontradas en las unidades de diálisis y consultorios odontológicos. Normalmente basan su alimentación en bacterias, hongos y partículas orgánicas pequeñas, aunque han sido catalogadas como patógenos emergentes, por su capacidad de infectar al ser humano con una rápida progresión y elevada mortalidad¹.

A mediados del siglo XX, las AVL se consideraban como organismos incapaces de causar enfermedades en el hombre, no obstante gracias al estudio de cultivos celulares realizado por Culbertson y col. (1958), se llegó a demostrar la patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. Posteriormente, se reportó el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), causada por la *Naegleria fowleri*, reportado por Flower y Carter en 1965 en Australia. En el año 1972 se demostró que *Acanthamoeba* pueden causar encefalitis granulomatosa amebiana (EGA), patología en la que también, se han visto involucradas especies de *Balamuthia*, que recibe su nombre en honor William Balamuth, el primer caso de infección fue descrito en San Diego, Estados Unidos en 1986 y por último, en 2001, en Texas, se confirmó el primer caso humano producido por *Sappinia*².

Actualmente, se conocen como géneros responsables de las infecciones humanas, causantes de patologías a nivel del SNC: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*³. Varias son las rutas de ingreso al hospedador, siendo la más común la vía nasal y ocular. Mientras que, la vía cutánea es solamente utilizada al encontrarse una lesión expuesta que es aprovechada por estos

protozoos; la invasión es selectiva como en los casos de *Acanthamoeba* y *Balamuthia* que ocurre por la depresión del sistema inmunológico⁴.

De esta manera, la presente investigación tiene como propósito, documentar las diferentes metodologías diagnósticas empleadas en el laboratorio clínico, para la determinación de infecciones por AVL en seres humanos. Dado que la evidencia indica que las patologías causadas por estos protozoos suelen ser subvaloradas en el momento de generar un diagnóstico al paciente, antes que la enfermedad llegue a la etapa crítica, desencadenando el fallecimiento.

En la actualidad, ha tenido un aumento considerable, el interés por conocer la manera correcta de identificar las AVL para poder realizar un diagnóstico oportuno y determinar la prevalencia e incidencia sin subregistros, debido a que los casos de infecciones humanas ocurren a nivel mundial tanto en zonas urbanas como rurales⁵.

Las AVL poseen gran importancia clínica, por ser agentes causales de infecciones agudas y crónicas, generalmente letales, afectando el sistema nervioso central, causando encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). Así mismo, afecta la piel, las mucosas y los pulmones, debido a la diseminación a través del árbol respiratorio. Mientras que, la afección ocular, es conocida como queratitis amebiana pudiendo terminar en ceguera temporal o permanente de pacientes que no reciben tratamiento adecuado. Lamentablemente, el diagnóstico oportuno no siempre es posible, pues la sintomatología asociada a estas enfermedades, suelen atribuirse a otras infecciones, sobre todo de origen bacteriano.

Es indispensable que, los profesionales de salud puedan diagnosticar estos protozoos, reconociendo los estadios morfológicos de trofozoítos, formas vegetativas que pueden causar daño al ser humanos y ser detectadas en tejidos o LCR. Aunque, los quistes son estructuras de resistencia, también pueden detectarse en las muestras biológicas^{6,7}.

Varias investigaciones describen la epidemiología de la infección por AVL en el ser humano. Así, a nivel mundial, se conocen aproximadamente 200 casos, desde el primer reporte de MAP realizado en Australia en 1965, por Fowler y Carter hasta el año 2002, según Turmińska y col. (2017), hasta ese año se conocieron 10 000 casos de queratitis amebiana (QA) producidas por *Acanthamoeba* spp.², Benito y col. (2018), registran en Estados Unidos 145 casos de

meningoencefalitis amebiana primaria desde 1962 hasta el 2018, solamente 4 pacientes han sobrevivido a la infección, debido a la rápida progresión de la patología⁵.

En Latinoamérica, existen reportes actuales, en Argentina durante el año 2017, se describió el caso de MAP en un niño de 8 años, cuyos síntomas iniciaron 24 horas después de nadar en una laguna localizada en Vedia, 15 días después de haberse sumergido en ese cuerpo hídrico, el resultado del laboratorio confirmó la presencia de *N. fowleri*, cuando el paciente ya había entrado en coma cerebral⁸.

En Perú, se identificaron 6 casos de EGA, diagnosticados post-mortem y registrados entre los años 1994-2010, todos los casos provenían de Departamentos costeros e ingresaron a las instituciones de salud con diagnóstico de tumor cerebral⁹.

En el año 2013, en Colombia, se conoció el caso de un adolescente de 14 años, con sintomatología de meningitis, quien falleció 5 días, después de la exposición a una fuente de agua, en el examen directo del líquido cefalorraquídeo se observaron trofozoítos móviles de *Naegleria fowleri*¹⁰.

Pertuz y col. (2016), en Venezuela describen en caso de queratitis por *Acanthamoeba* spp., en una mujer portadora de lentes de contacto semiblandos, al inicio fue diagnosticado erróneamente como queratitis herpética¹¹.

En Ecuador, no existen publicaciones sobre reportes de casos humanos asociados a infecciones por AVL en seres humanos y tampoco estudios sobre las técnicas para el diagnóstico de laboratorio de estos parásitos. Sin embargo, Fierro y col. (2019), realizan un importante estudio que alerta sobre la presencia de amebas de vida libre (AVL) en aguas termales en la provincia de Pichincha¹². Al ser estas infecciones emergentes y cada vez más frecuentes, sobre todo en países vecinos, permite alertar sobre la necesidad de establecer el diagnóstico humano de estos protozoos en nuestro país.

El desconocimiento del diagnóstico de Laboratorio de estas amebas y la patogenia que estos microorganismos producen, en especial la causada por *Acanthamoeba* spp. y *N. fowleri*, constituye un factor de riesgo a nivel sanitario, por tal razón se considera necesario, realizar una investigación enfocada en las técnicas y procedimientos que se requieren para la determinación

mediante el diagnóstico de laboratorio, de estos agentes infecciosos, por la rápida evolución y fatal impacto en el organismo humano, que probablemente han impedido realizar un diagnóstico específico y oportuno en nuestro país.

Se torna relevante, indicar que la sintomatología asociada a estas infecciones por AVL, tienen una estrecha semejanza con enfermedades producidas por otros microorganismos (bacterias, virus y hongos), generando confusiones tanto en el diagnóstico, como en la instauración del tratamiento, llegando a provocar sesgos en el registro de datos, por la atribución a patógenos equívocos. Por tal razón, es necesario que se incluya el diagnóstico de laboratorio clínico de AVL en casos clínicos y epidemiológicamente sospechosos, pues en la mayoría de los pacientes la determinación se ha realizado post-mortem.

La falta de experiencia de los analistas en el territorio ecuatoriano, comprobada por la ausencia de reportes y de estudios relacionados con las metodologías diagnósticas para la identificación, de estos patógenos amebianos de vida libre, en muestras biológicas humanas, reduce la probabilidad de identificación de manera precoz y confiable. En países colindantes Perú y Colombia, se han reportado casos aislados, con elevada tasa de mortalidad, que asciende hasta el 95%, sobre todo en las infecciones del SNC¹².

Por esta razón, se considera importante documentar las diferentes metodologías diagnósticas que se pueden aplicar en el laboratorio clínico, para la detección de AVL en seres humanos, con el fin de generar un aporte a la salud pública, debido a que el diagnóstico precoz de estos parásitos permitirá instaurar la terapia apropiada en el paciente, tratando de evitar consecuencias fatales.

Con la finalidad de realizar los aportes descritos, la presente investigación se ha organizado en los siguientes capítulos: en el Capítulo 1, se presenta y analiza estudios previos relacionados con el tema que dará sustento teórico, científico al proyecto, se describe la definición, origen evolutivo posterior al contagio y metodologías para diagnóstico de laboratorio clínico en infección humana por AVL.

En el Capítulo 2 se detalla el diseño de la investigación, población y muestra objeto de estudio, métodos de recolección de datos y las técnicas de procesamiento de los mismos.

Dentro del Capítulo 3, se describe el análisis y discusión de los resultados de la investigación, se incluye el algoritmo de diagnóstico con los diferentes métodos y técnicas de laboratorio clínico utilizados y se exponen las principales conclusiones. Finalmente, se registra la bibliografía y los anexos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Recopilar información relacionada con el diagnóstico de laboratorio clínico de la infección humana por amebas de vida libre, a partir del análisis de fuentes de información primaria y secundaria, que será analizada y desarrollada sirviendo como línea base para la presente investigación.

Objetivos Específicos

- Especificar los géneros de amebas de vida libre que ocasionan infección humana, según los estudios publicados, para determinar aquellos que parasitan con mayor frecuencia.
- Comprobar la prevalencia de la infección humana causada por amebas de vida libre, con el levantamiento de la información recopilada, para conocer las patologías que producen.
- Diseñar un algoritmo de diagnóstico con los diferentes métodos y técnicas utilizados, a partir de la información obtenida en documentos suscritos, que contribuya con el conocimiento necesario para que los laboratoristas clínicos realicen el análisis oportuno.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Amebas de Vida Libre

Son considerados protozoos, cosmopolitas por presentar una distribución mundial, por su dispersión en diversos ambientes naturales y artificiales; encontrados en aire, tierra y fuentes hídricas. Además, en superficies usadas cotidianamente como grifería y recipientes para conservar lentes de contacto. Ocasionalmente, estos organismos pueden infectar a humanos y animales; tanto inmunocomprometidos como sanos, de esta manera se han identificado en mucosas de las vías aéreas altas y bajas, mucosas oculares y tejido corneal, ulceraciones cutáneas, cerumen de oídos, heces, LCR y tejido del SNC¹³.

Gertiser y col. (2015), han definido a estos protozoos como amebas anfitriónicas, por ser parásitos de vida libre que tienen la capacidad de adaptarse a la vida dentro de otro ser vivo. Entre las características biológicas se destaca su capacidad para desplazarse a través de pseudópodos, que también son utilizados para englobar partículas con las que se alimentan mediante procesos de fagocitosis. Suelen ingerir bacterias, con las que establecen vínculos simbióticos, que les permiten actuar como reservorio de *Mycobacterium* spp., *Vibrio cholerae* y *Legionella pneumophila*, que muestran capacidad de supervivencia dentro del fagosoma parasitario, independientemente de las condiciones del ambiente¹³.

La literatura, describe diferentes géneros y especies de AVL, aunque no todas son patógenas, solamente se ha involucrado *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia*, *Vermamoeba vermiformis* y *Paravahlkampfia* spp., como especies causantes de infecciones humanas oculares y cutáneas, así como, la característica alteración del SNC donde producen lesiones crónicas, inflamatorias, granulomatosas y necróticas generalmente mortales 13,14-17.

Se torna necesario, la consideración de las AVL como patógenos principales y aprovechadores de la inmunodeficiencia humana, causando infecciones múltiples, que se diseminan en el organismo de forma rápida e inadvertida, de este modo, su diagnóstico resulta verdaderamente complicado tanto clínicamente, como a través del análisis morfológico por observación directa

en el Laboratorio¹⁶. Debido al bajo conocimiento de estos agentes amebianos causales de infecciones en el ser humano y los cuadros clínicos no reconocidos, el diagnóstico se torna difícil, trayendo como consecuencia, tratamiento tardío y datos inexactos en los registros⁹.

Se ha reconocido la mayor importancia epidemiológica y por lo tanto, la principal alerta de atención sanitaria, en torno a los géneros *Acanthamoeba* spp., y *Naegleria*, debido a su mayor prevalencia y por causar daños a nivel del SNC, con un amplio margen de morbilidad y mortalidad.^{17,18}.

En este sentido, durante el año 2019, el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Español, con el fin de contribuir al diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de las infecciones amebianas, publicó un protocolo estandarizado de métodos diagnósticos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la detección rápida y específica de *Acanthamoeba* spp., se implementaron con éxito dos protocolos de PCR convencional y una PCR a tiempo real con límites de sensibilidad de 0,5 pg/μL, 2 pg/μL, y 1 pg/μL, respectivamente. Se aisló *Acanthamoeba* de una muestra (1%) de los 110 líquidos conservantes de lentes de contacto de usuarios aparentemente sanos analizados, mediante cultivo. Mejorando notablemente la detección con la PCR, debido a que, la carga parasitaria en el líquido conservante fue inferior a los límites de detección de las técnicas moleculares¹⁹.

1.2. Ciclo de vida

Todas las amebas de vida libre presentan trofozoíto como forma vegetativa, activa, que se alimenta, se reproduce y se mueven por la emisión de pseudópodos a excepción del caso de *Naegleria* que, siendo trofozoíto ameboide, puede emitir flagelos para desplazarse en medios líquidos. Los quistes son la forma de resistencia porque los recubre una gruesa membrana que le permite sobrevivir en las condiciones adversas del medioambiente.

Los trofozoítos de AVL generalmente ingresan al organismo humano, a través de la inhalación de aguas contaminadas, mientras que, las formas quísticas ingresan con el polvo y la tierra. Una vez dentro de la mucosa nasal, viajan a través de las cintillas olfatorias hasta llegar al hueso etmoides, específicamente la lámina cribosa, para luego atravesar el bulbo olfatorio y llegar al tejido encefálico²⁰.

Posteriormente, se multiplican activa y rápidamente formando una especie de nidos de amebas, al adherirse a proteínas específicas del tejido, causando hemorragias y lesiones, principalmente en las zonas basales de cerebro y cerebelo, el período de incubación varía entre 4 a 7 días en caso de MAP y de 10 días hasta algunos meses para EGA⁴.

Para otras patologías, como amebiasis cutánea, las úlceras se producen por diseminación de los parásitos vía hematogena, al originarse la infección en otros órganos contiguos o a su vez, actuar como puerta de entrada la lesión cuando se ha perdido la integridad de la piel. Para la queratitis o queratoconjuntivitis, también es necesario un daño en el tejido corneal²⁰.

1.3. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica clásica de los parásitos va de acuerdo con la jerarquía del reino, filo, clase, subclase, superorden y orden, en donde figuran cuatro grupos: Sarcodina (amebas), Mastigophora (flagelados), Sporozoa (esporas y protozoos parásitos) e Infusoria (ciliados). Recientemente la Sociedad Internacional de Protozoología instauró un nuevo sistema de clasificación que se basa en las características morfológicas, rutas bioquímicas y filogenia molecular de las amebas, clasificándolas en seis grupos⁵. El género *Acanthamoeba* spp., ha sido ubicado dentro del super grupo Amoebozoa, en la categoría Acanthamoebidae, cuya principal característica es la presencia de pseudópodos, que son proyecciones espinosas superficiales conocidos también como acantopodios y una forma de resistencia o quiste²¹.

1.4. Amebas de vida libre patógenas

1.4.1. Acanthamoeba

Los trofozoítos se caracterizan por tener 1 núcleo con cariosoma central, el citoplasma finamente granular, tamaño entre 10 a 60 μ , posee pseudópodos afilados (acantópodos) que generan un movimiento lento. Los quistes mantienen un único núcleo con cariosoma central, poseen forma poliédrica, miden entre 10 a 25 μ y se destaca la doble pared quística (externa: rugosa e interna: poligonal)²².

Fueron identificadas por primera vez en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus*, en el año 1930, por el investigador Castellani²². En la actualidad constituyen uno de los géneros más frecuentes,

cuyas especies producen patologías en el ser humano, se les ha asociado con graves patologías a nivel del SNC humano¹⁶, entre las especies se describen: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi*, *A. divionensis*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. palestinensis*, *A. quina*, *A. rhyodes*¹³.

Acanthamoeba, logra infectar de manera oportunista y no oportunista, afecta a personas con un sistema inmunológico deficiente, como pacientes VIH, individuos bajo tratamiento de quimioterapia o inmunosupresión terapéutica; provocando enfermedades como: EGA, a nivel del sistema nervioso central. Con menor frecuencia, se describen casos de acanthamebosis cutánea, sinusitis y amebiosis diseminada^{14,22}. Como no oportunista, en personas sanas es el agente causal de queratitis amebiana y queratoconjuntivitis amebiana^{23- 24}.

Existen dos vías de entrada para este protozoo, en el caso de queratitis amebiana, a través de los ojos, específicamente lesiones en la córnea o conjuntiva y para EGA, a través de la vía nasal o ulceraciones en la piel¹⁴. La patología da inicio, gracias a la capacidad, del parásito para fagocitar las células del tejido infectado. Posterior a ello, bloquean totalmente la división celular, evitando la regeneración tisular y provocando apoptosis.

La patología es frecuente en personas con lentes de contacto, el cuadro clínico se inicia con inflamación del estroma corneal, los pacientes presentan lagrimeo, fotofobia y enrojecimiento del ojo, sino se trata de manera inmediata, puede causar pérdida de la visión²⁴.

1.4.2. Naegleria

Morfológicamente se distingue porque los trofozoítos pueden ser ameboides o flagelados. El trofozoíto ameboide mide entre 10-20 μ , posee la membrana celular arrugada y 1 núcleo con cariosoma central, emite solamente 1 pseudópodo y se reproduce por fisión binaria. Fagocita eritrocitos, leucocitos y microorganismos. Mientras que, el trofozoíto flagelado (ameboflagelado), es piriforme, emite 2 flagelos por el extremo anterior y no se multiplica, es un estadio temporal, su crecimiento es óptimo en un rango de temperaturas que oscila entre 37 y 45°C. Los quistes son esféricos y miden entre 7-10 μ , poseen una pared lisa y se mantienen uninucleados. Los quistes se encuentran en el medio ambiente, pero no en el tejido.

Es un patógeno protista, ampliamente disperso en el medio ambiente, existen varias especies: *N. gruberi*, *N. australiensis*, *N. itálica*, sin embargo, la única especie que infecta al ser humano es *N. fowleri*, ésta puede acceder al SNC del ser humano y causar MAP²⁵. Siendo una ameba de vida libre, puede cambiar de fenotipo dependiendo de las condiciones ambientales. En condiciones favorables, exhibe una etapa de trofozoíto reproductivamente activa, esta se considera la etapa infecciosa. En condiciones adversas, pero dentro de un ambiente hídrico, los trofozoítos cambian a una etapa flagelada transitoria que permite el movimiento, en considerables distancias, a menudo en busca de alimento. Cuando el ambiente es desfavorable, los trofozoítos cambian a forma quística, manteniendo un metabolismo inactivo o latente, que no requiere nutrirse, y tampoco se reproduce²⁶.

Fierro y col. (2019), reiteran en su estudio, que los parásitos pueden ingresar a los hospedadores a través de la vía nasal logrando pasar al sistema nervioso central, donde causan inflamación y hemorragia severa, produciendo daño cerebral en pocos días. Esta enfermedad afecta principalmente a individuos sanos independiente del grupo etario, que asisten regularmente a piscinas. Se ha demostrado la importancia de las altas temperaturas para el desarrollo de las amebas, *N. fowleri*, debido a su hallazgo principalmente en aguas termales y el aumento del número de casos en verano¹².

1.4.3. *Balamuthia*

La morfología de *B. mandrillaris* se caracteriza porque tanto trofozoítos como quistes poseen un núcleo vesicular de gran tamaño, el citoplasma se encuentra rodeado por una pared celular de tres capas. Los trofozoítos miden aproximadamente entre 10-30 μ de diámetro y los quistes son esféricos y alcanzan entre 6-16 μ de tamaño.

B. mandrillaris el primer caso humano se registró en 1991, en un paciente inmunosuprimido²⁷, la información sobre la fuente de infección es escasa y no se conoce con certeza cuál es la vía de entrada al organismo. Ha sido aislada de la tierra, por lo que la manipulación de la misma o la inhalación de quistes adheridos a las partículas de polvo que son arrastradas por el viento podrían ser una fuente de infección²⁷.

Schuster y col. (2016), indican recientemente, que *B. mandrilaris* se ha aislado en muestras de agua, por lo que también podría actuar como vehículo para su transmisión, pero no existe hasta el momento, el reporte de casos asociados con actividades acuáticas²⁷. La EGA producida por esta ameba es una infección crónica, subaguda, de desarrollo lento e insidioso, pudiendo desarrollarse entre 2 semanas y 2 años. Las manifestaciones clínicas son variables, pero en la mayoría de los pacientes se presenta como una encefalopatía focal o difusa, con signos de irritación meníngea²⁸.

El cuadro clínico incluye cefalea intensa, fotofobia, náusea, vómito, fiebre, mialgias, pérdida de peso. En algunos pacientes, suele aparecer lesiones infiltrativas ulcerosas en la cara generalmente en la región centro-facial o las extremidades, pero en reiteradas ocasiones se ha observado en rodillas y tronco. Los pacientes también pueden presentar rinitis, sinusitis u otitis. Estas lesiones primarias en piel duran semanas o meses y preceden otros síntomas graves en SNC^{17,25}.

1.4.4. *Sappinia*

Morfológicamente presentan dos estadios trofozoítos y quistes. El trofozoíto puede medir entre 45 y 76 μm , posee la membrana superficial con algunas pequeñas arrugas, 2 núcleos vesiculares de gran tamaño, uno frente al otro y unidos por una conexión central plana, emite 1 pseudópodo y su reproducción es por fisión binaria. Los quistes son esféricos poseen doble pared y miden entre 30 - 34 μm , poseen entre 1 y 8 núcleos idénticos a los del trofozoíto.

Este protozoo fue descubierto en 1896 por Pierre Augustin Dangeard y le dio su nombre en homenaje al micólogo Sappin-Trouffy. En 2001, se confirmó el primer caso humano infectado por *Sappinia*, en un hombre de 38 años no inmunodeprimido que presentó EGA, quien después de haber sido tratado con varios antibióticos se recuperó satisfactoriamente. *Sappinia* se puede cultivar a temperatura ambiente en agar no nutritivo recubierto con bacterias como *Enterobacter cloacae*. su multiplicación requiere 3 a 10 días²⁹.

1.5. Patologías más frecuentes causadas por las AVL

Son diversas las patologías causadas por estos microorganismos, sin embargo, se resumen las más frecuentes:

1.5.1. Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)

Es considerada una infección de curso progresivo, lento y muchas veces crónico, llegando a afectar el SNC en su totalidad, cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo. La mayoría de los casos reportados han concluido con el fallecimiento del paciente, en periodos variables, que pueden ir desde semanas a meses.

El ingreso del protozoo al hospedador puede ser, a través de la vía nasal, por lesiones en la piel o en el ojo²³. La principal puerta de entrada ha sido la vía respiratoria, desde donde continúa por la ruta neuroepitelial olfatoria y migra desde las fibras nerviosas hasta el cerebro. La infección también puede alcanzar el SNC por diseminación hematológica, al penetrar la barrera hematoencefálica, generalmente por ruptura de pequeños vasos sanguíneos de la nariz, cuando los individuos se zambullen en el agua²². Una vez en el tejido nervioso, los trofozoítos de *Acanthamoeba*, fagocitan las células, secretando enzimas que destruye la matriz extracelular y le proveen de nutrientes, facilitando la invasión amebiana²³.

La patología, prosigue una evolución clínica subaguda, su periodo de incubación es de aproximadamente 14 días. Mediante imágenes obtenidas en tomografías o resonancias magnéticas se puede apreciar las tumoraciones causadas por el daño al tejido. En dependencia del sitio de instauración de la infección, se desarrollará el cuadro clínico, pero de manera general, se puede encontrar aumento de la presión intracraneal, parálisis de los nervios craneales, deterioro en el estado de conciencia, convulsiones, coma y muerte^{20,11}.

En los análisis post-mortem de cortes histológicos en pacientes con EGA, se han observado áreas necróticas, severas hemorragias, tejido edematizado y seriamente afectado con irritación meníngea. El diagnóstico se completa al observar trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* en mayor proporción y *Balamuthia* con menos frecuencia¹³.

1.5.2. Queratitis amebiana (QA)

Esta entidad patológica constituye un compromiso serio para la visión, ocasiona intenso dolor, llegando a generar fibrosis corneal que desencadena una ceguera permanente en los pacientes. Las AVL son capaces de generar reinfección, debido a que no se desarrolla inmunidad

protectora tras una primera infección^{24,30}. Varias son las especies de *Acanthamoeba*, causantes de estas patologías, Se caracterizan por provocar inflamación y una reacción granulomatosa, con proliferación de células mononucleares y polimorfonucleares en la córnea y la conjuntiva²⁴.

En la infección causada por el género *Acanthamoeba*, se desarrolla una necrosis corneal progresiva, cuando se presenta este cuadro, aparecen como primera línea de defensa los macrófagos³¹. Es necesario, destacar la importancia de las células de Langerhans, cuya función en el epitelio corneal es la prevención de lesiones, dado que los protozoos pueden atacar únicamente cuando esta estructura se encuentra dañada, pues la expresión de las glicoproteínas que le sirven de anclaje a *Acanthamoeba* se expresan, 1,8 veces más en un epitelio corneal atrofiado²⁴.

La sintomatología se presenta cuando el paciente intenta ponerse el lente de contacto, por lo general, se presenta dolor intenso, lagrimeo y fotofobia¹⁵. Al examen físico, el oftalmólogo evidencia erosiones anómalas, opacidad e infiltrados epiteliales. Con la progresión de la enfermedad, va disminuyendo la visión y se agrava el daño en la córnea a tal punto de llegar a perder de visión. El diagnóstico de la queratitis por AVL debe sospecharse clínicamente, sobre todo en pacientes que usan lentes de contacto, debido a la similitud del cuadro clínico, debe realizarse diagnóstico diferencial de queratitis bacteriana o herpética^{14,31}.

Argentina es uno de los países con mayor índice de reportes de queratitis, con un total de 27 publicaciones, de casos tanto sospechosos como confirmados, detectados entre los años 2008 y 2012³². En el Hospital Santa Lucia, en Bahía Blanca-Argentina se identificaron 20 casos con lesiones oculares producidas por AVL, todos, coincidían en que el motivo de la consulta fue dolor ocular intenso, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, prurito, lagrimeo e irritación. Al realizar el estudio epidemiológico de cada caso, se detectó que 10 pacientes eran usuarios de lentes de contacto; 2 registraron cirugía refractiva; 1 desarrolló queratitis bilateral después de la limpieza de un tanque de agua; otro había sufrido un traumatismo con la astilla de un árbol; otros 3 habían tomados baños de inmersión en estanques y el último paciente sufrió traumatismo por entrada de arena en sus ojos en un día ventoso^{13,33}.

1.5.3. Amebiosis cutánea (AC)

Considerada como una enfermedad poco frecuente, es caracterizada por deteriorar la epidermis, dermis e hipodermis, siendo la piel lesionada la mejor vía de ingreso³⁴. La infección cutánea, se puede presentar de manera primaria, en úlceras o daños preexistentes y secundariamente por diseminación por vía hematógena desde otros órganos infectados, caracterizada, por lesiones ulcerosas en la piel con secreción purulenta³⁵. El diagnóstico se realiza a través, de un examen histológico, tomando muestras de estas lesiones, se puede observar, necrosis del tejido, rodeado por quistes y trofozoítos. Los géneros mayormente involucrados en estos cuadros clínicos han sido en primer lugar *Acantamoeba* seguido de *Balamuthia*³⁴.

1.5.4. Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP)

Es llamada meningoencefalitis amebiana primaria para diferenciarla de la ocasional invasión del SNC por *Entamoeba histolytica*, donde puede producir lesiones, siempre secundarias a la colonización intestinal o visceral. Es una enfermedad de curso agudo y fulminante, produciendo la muerte del paciente dentro de pocos días después de la infección, afecta específicamente las meninges, su período de incubación es de 3 a 7 días, el parásito ingresa a través del neuroepitelio olfatorio migrando por la lámina cribosa del hueso etmoides, utilizando la ruta neuroepitelial para posteriormente dirigirse hacia el espacio subaracnoideo donde se desarrolla la enfermedad ocasionando una necrosis hemorrágica a nivel del SNC¹⁸.

La mayoría de los casos son causados por *Naegleria fowleri*, los escasos reportes de sobrevivientes calculan la mortalidad en más del 95%. Los primeros síntomas se inician de manera abrupta con cefalea frontal o bitemporal, fiebre dolor de espalda y rigidez de la nuca, seguido por náusea, vómito, irritabilidad, convulsiones y astenia^{16,21}.

A nivel mundial se han descrito alrededor de 235 casos, la mayoría de ellos en niños y jóvenes inmunocompetentes. La epidemiología de los casos indica que existe una asociación entre actividad acuática y posibilidad de adquisición del agente causal, incluyendo el buceo desnudo, la inmersión y la zambullida, donde los golpes recibidos en la nariz rompen pequeños vasos sanguíneos por los que puede penetrar estos protozoos, lo que se ha relacionado a la posible adquisición de esta enfermedad³¹. Debido a lo agresivo del cuadro, el diagnóstico de la MAP

ocurre post-mortem. La inespecificidad de los síntomas, pueden ser los factores que expliquen el diagnóstico tardío.

Diferencia de *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia* en la patología de encefalitis granulomatosa amebiana (EGA)

Según la bibliografía consultada, la EGA, es una infección donde el diagnóstico diferencial se realiza generalmente por la diferenciación morfológica de los estadios evolutivos de los géneros. Así, en el caso de *Acanthamoeba* se reconocen quistes de pared doble y trofozoítos con pseudópodos muy finos(acantópodos) emite varios a la vez. *Balamuthia* posee quiste de pared triple y trofozoítos que emite varios pseudópodos, ambos géneros afectan generalmente a individuos inmunosuprimidos. Mientras que, *Sappinia* presenta quiste de pared doble y trofozoítos emite 1 solo pseudópodo, afectan a individuos inmunocompetentes, los síntomas son similares lo que imposibilita el diagnóstico clínico.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Enfoque

De carácter cualitativo, porque se trabajó con la recolección de datos de las diferentes fuentes bibliográficas.

2.2. Tipo de estudio

Cohorte transversal puesto que las variables se han medido en una sola ocasión, realizando un corte en el tiempo, estableciendo un periodo comprendido entre mayo-octubre 2020.

2.3. Nivel de Alcance

De tipo exploratorio, ya que el objetivo del estudio implica en la recopilación y selección de artículos relacionados con la investigación de carácter científico publicados en revistas e indexas en bases reconocidas.

2.4. Diseño

Documental, ya que se recopiló información de varias fuentes bibliográficas, entre ellas, libros, artículos, revistas, monografías, tesis, etc., con el objetivo de obtener la mayor información posible que sustente teórica y científicamente el tema de estudio.

2.5. Población

La población de estudio está constituida por 85 fuentes bibliográficas de carácter científico entre ellos documentos del Ministerio de Salud Pública, artículos científicos y tesis de pre y postgrado obtenidos de Revistas registradas en Scielo, Pubmed, Medline, Lilacs, Scopus, BVS, Dialnet y Google Académico. Así como, folletos, páginas Web, información de foros, entre otros, ya que son de interés y a través, de la información recopilada en ellos, se obtiene el conocimiento con el que se podrá hacer inferencias y obtener conclusiones.

Como resultado de la búsqueda se tomó como población de estudio un total de 85 documentos científicos: 72 artículos, 4 tesis de pregrado, 4 tesis de posgrado, 2 libros y 2 protocolos de investigación y 1 artículo de periódico. Contenidos en revistas científicas, plataformas de las Bibliotecas de Universidades y de los Ministerios de Salud. A través, de la técnica de filtración bajo los criterios de inclusión y exclusión, se estableció una muestra de 41 documentos: 30 artículos, 4 tesis de pregrado, 4 tesis de posgrado, 1 libro y 1 protocolo de investigación y 1 artículo de periódico, en los cuales se aborda de manera específica las técnicas de metodología diagnóstica de laboratorio clínico y los géneros de amebas de vida libre (AVL) causantes de infección humana o contaminantes del medioambiente.

2.6. Muestra

La muestra está constituida por 41 fuentes bibliográficas de carácter científico, entre ellas constan: Scielo 10 artículos, Pubmed 8 artículos, Medline 3 artículos, Lilacs 3 artículos, Scopus 4 artículos, BVS 2 artículos, Dialnet 4 Tesis de pregrado, 1 protocolo de investigación y 1 artículo de Periódico, Google Académico 4 Tesis de posgrado y 1 libro.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión que permitieron seleccionar los artículos y documentos científicos fueron que no estuvieran repetidos, que aporten información importante a los objetivos de la investigación, que sean actuales y que se pueda acceder al documento completo, para poder obtener la información completa.

Los 41 documentos obtenidos, a través de métodos de análisis y síntesis bajo lectura crítica, permitieron descubrir hechos y orientar la investigación. Para ello fue necesario identificar el autor, objetivos de estudio, métodos, técnicas y resultados. Entre artículos, tesis y protocolos de investigación, se trianguló la información, permitiendo establecer comparaciones.

Criterios de exclusión

Los criterios analizados para excluir los artículos y documentos de investigación fueron: que no contuvieran información de importancia o relacionada con los objetivos del trabajo, que fueran publicados hace más de 5 años, que no se pudieran obtener los documentos completos, lo que resultó en la eliminación de 44 documentos.

2.7. Estrategia de búsqueda

Para el presente trabajo de investigación, se ha realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica, dentro de las principales fuentes y bases de datos biomédicas anteriormente nombradas. El esquema de búsqueda se inició con la identificación de las fuentes y bases documentales, seguida de la selección de artículos y documentos científicos.

Posteriormente, se aplicó la técnica de filtración en dos fases de exclusión; en la primera se evaluaron todos los documentos duplicados, mientras que, en la segunda se manejaron criterios: fecha de publicación, pertinencia del tema de estudio; idioma español e inglés y acceso a textos completos en PDF.

En el caso de los artículos científicos revisados que se encontraban en inglés, fue necesario realizar la respectiva traducción mediante la utilización del Software gratuito de Traducción languag de Babylon. Sin embargo, se utilizaron bases de datos como Scielo y Latindex, SCOPUS, que proporcionaron una extensa cantidad de documentos en idioma español, lo que facilitó la adquisición de información relevante.

Para la exploración activa se utilizaron, palabras y frases clave en español como: amebas de vida libre y diagnóstico; amebas de vida libre patología en humanos; diagnóstico de laboratorio de AVL, patologías por AVL, epidemiología de patología en humanos por amebas de vida libre. Así como, en inglés: free-living amoebas and diagnosis; free-living amoebae pathology in humans; laboratory diagnosis of AVL, AVL pathologies, epidemiology of pathology in humans due to free-living amoebae

Además, para una búsqueda precisa y rigurosa, se aplicó el método de la Lógica de Operadores Booleanos, el cual indica, la combinación de palabras clave y conectores, para obtener como resultado artículos validos con el objetivo de investigación, es así, que se usó comillas para unir palabras, AND para reducir los resultados a términos concisos, al añadir el signos (+) se obtuvo similar efecto, OR amplifica los resultados y NOT excluye términos, se prefirió restringir el uso de este conector, para evitar confusiones con el buscador en la base de datos.

Dentro de la investigación documental, se definieron los siguientes criterios de selección:

1. Originalidad: no se admiten documentos duplicados y sin resumen.
2. Pertinencia: donde, todos los artículos seleccionados, tengan íntima relación con el tema de estudio.
3. Tiempo de publicación: no menos de 5 años, para sostener una información de carácter actual.
4. Obtención completa del manuscrito del artículo en archivo PDF.

2.8. VARIABLES DE ESTUDIO

Variable independiente: Infección humana por Amebas de Vida Libre

Variable dependiente: Diagnóstico de laboratorio clínico.

Tabla 1. Operacionalización de variable

VARIABLE	TIPO	ESCALA	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR
Diagnóstico de laboratorio clínico	Variable dependiente	Metodologías diagnósticas de laboratorio clínico.	Metodologías diagnósticas de laboratorio clínico: Para la descripción de las técnicas en la detección de AVL, se tiene: <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico Parasitológico. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Diagnóstico inmunológico. 	Porcentaje de diagnósticos de laboratorio clínico, reportados y publicados en contenido científicos.
Infección humana por Amebas de Vida Libre.	Variable independiente	Prevalencia de infecciones de AVL en seres humanos	Prevalencia de infecciones de AVL en seres humanos: Se debe considerar a las amebas de vida libre como agentes infecciosos emergentes, tanto patógenos primarios como oportunistas. Dado que la evidencia indica que las patologías causadas por estos protozoos suelen ser subvaloradas a la hora de buscar y generar un diagnóstico.	Número de casos reportados y publicados en contenido científicos.

2.9. MÉTODOS DE ESTUDIO

Métodos empíricos

Porque esta investigación se apoyó en artículos científicos, de carácter experimental y de lógica empírica, que junto a la observación de fenómenos y sus análisis estadísticos presentan resultados.

Métodos teóricos

Debido a que se analizaron, varias fuentes bibliográficas, con la finalidad de generar una síntesis documental, sobre el tema de estudio.

2.10. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Técnica: Análisis documental, ya que se recolectaron datos de fuentes primarias y secundarias como artículos científicos, libros, revistas, boletines, tesis de pregrado y posgrado, entre otras; para comprender las variables de interés.

Instrumento: Ficha de registro y análisis de datos.

2.11. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

Análisis de contenido

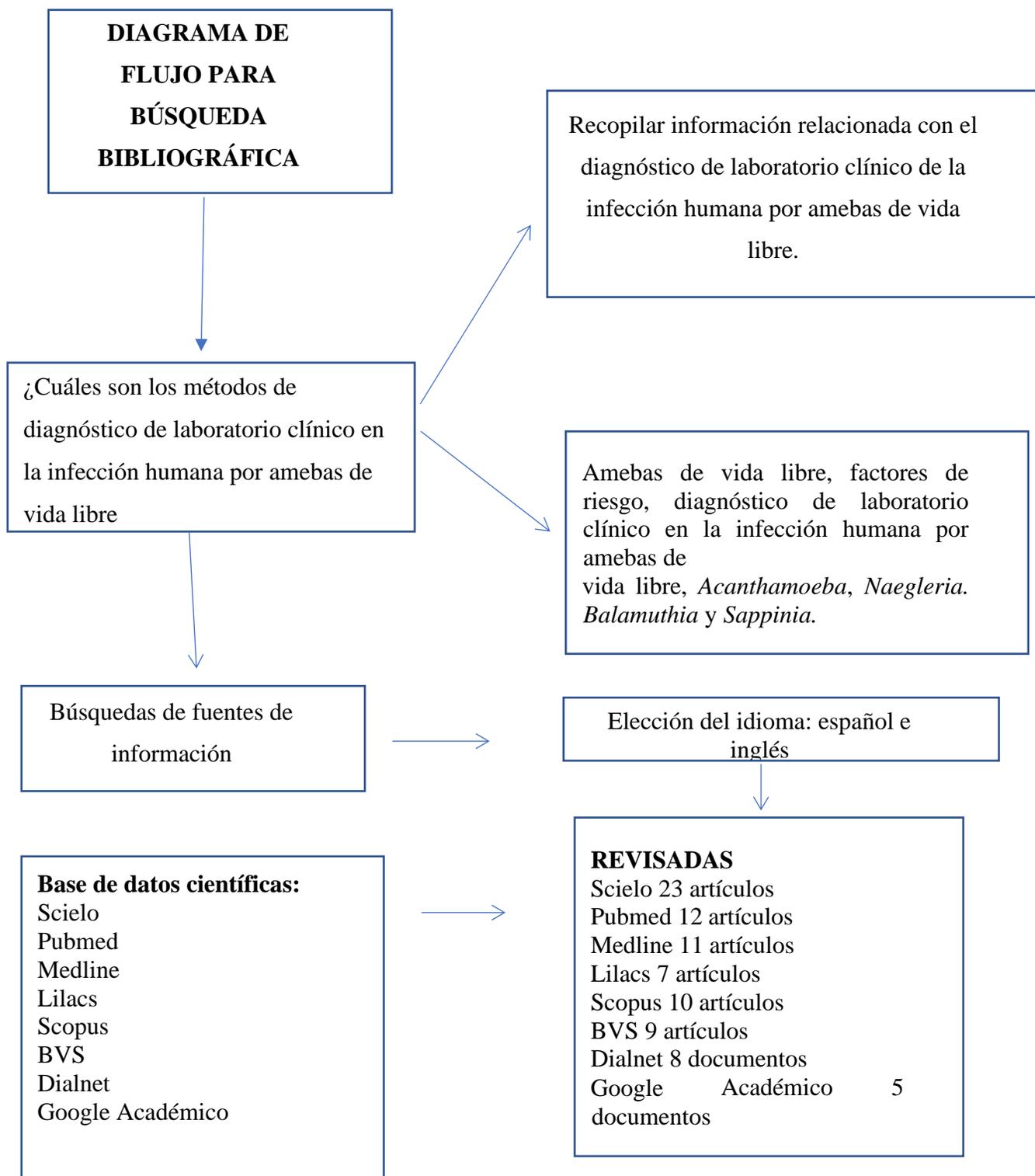
Este proceso está basado en la descomposición del texto objeto de estudio en fragmentos significativos, llamados unidades de análisis, y luego en la categorización de cada unidad de acuerdo con su contenido manifiesto.

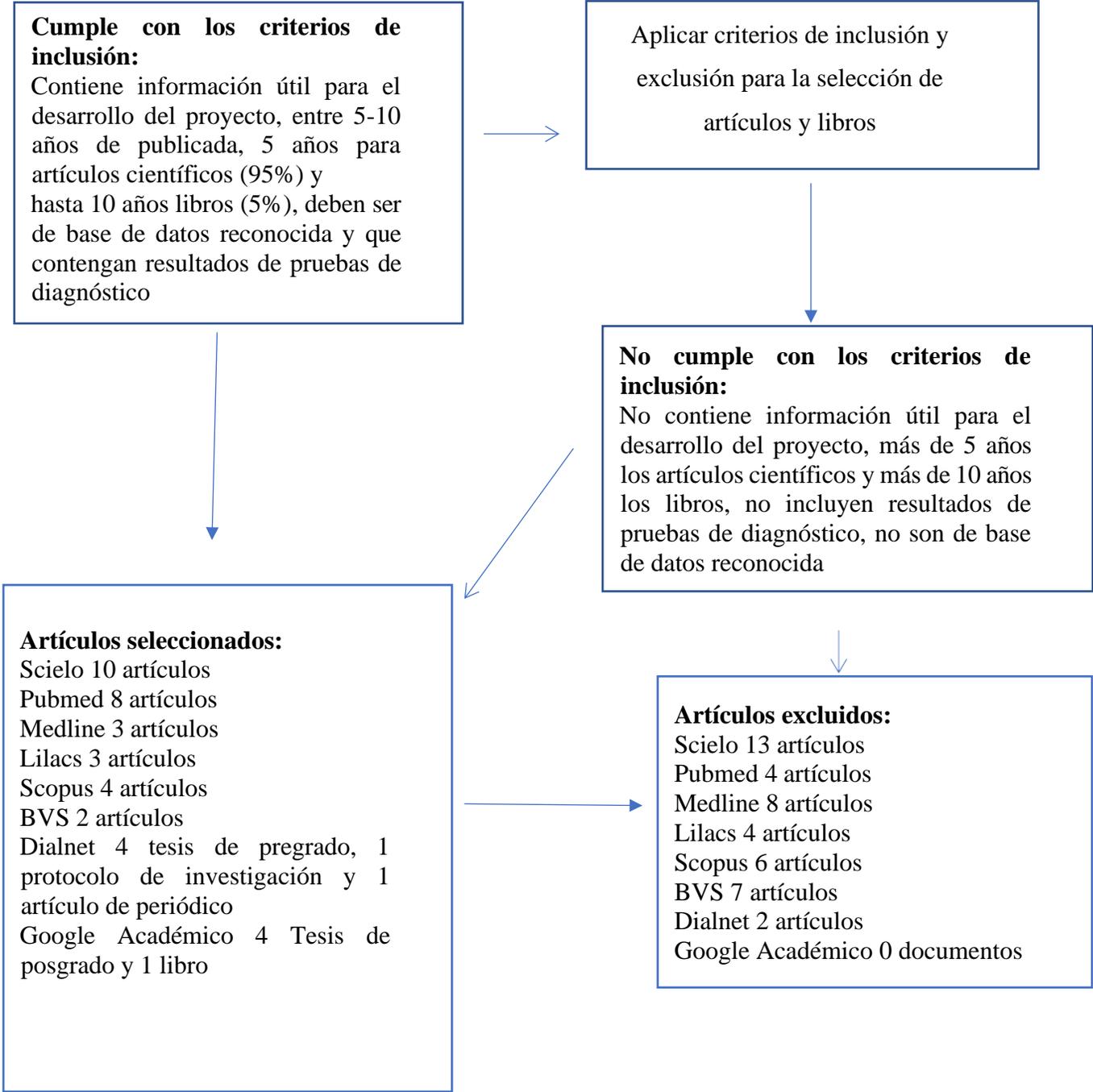
Consideraciones éticas

El presente proyecto cumple con los estándares éticos para su elaboración, al ser de carácter bibliográfico no afectará, ni pondrá en peligro la integridad del ser humano.

Dentro de la revisión bibliográfica, se respetó el mérito científico, del autor o grupo de investigadores, incluyendo la competencia para indagar, comparar y hacer inferencias respetando la idea base, con el objetivo de enriquecer la discusión e incrementar el ámbito de conocimientos, además, el estudio aporta beneficios de carácter social.

Ilustración 1. Algoritmos de búsqueda bibliográfica de la literatura: artículos identificados en bases de datos, seleccionados para integrar la revisión.





Cumple con los criterios de inclusión:

Contiene información útil para el desarrollo del proyecto, entre 5-10 años de publicada, 5 años para artículos científicos (95%) y hasta 10 años libros (5%), deben ser de base de datos reconocida y que contengan resultados de pruebas de diagnóstico

Aplicar criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos y libros

No cumple con los criterios de inclusión:

No contiene información útil para el desarrollo del proyecto, más de 5 años los artículos científicos y más de 10 años los libros, no incluyen resultados de pruebas de diagnóstico, no son de base de datos reconocida

Artículos seleccionados:

Scielo 10 artículos
 Pubmed 8 artículos
 Medline 3 artículos
 Lilacs 3 artículos
 Scopus 4 artículos
 BVS 2 artículos
 Dialnet 4 tesis de pregrado, 1 protocolo de investigación y 1 artículo de periódico
 Google Académico 4 Tesis de posgrado y 1 libro

Artículos excluidos:

Scielo 13 artículos
 Pubmed 4 artículos
 Medline 8 artículos
 Lilacs 4 artículos
 Scopus 6 artículos
 BVS 7 artículos
 Dialnet 2 artículos
 Google Académico 0 documentos

CAPÍTULO III

3. DESARROLLO

3.1. Prevalencia de la infección humana causada por AVL

A nivel mundial, se han identificado casos humanos de AVL históricamente las enfermedades producidas por estas amebas han sido descritas a partir de 1948, cuando se comunicó el caso de un soldado japonés de 22 años que fuera capturado como prisionero de guerra en Nueva Guinea, y que falleció 7 semanas más tarde con una infección amebiana diseminada^{6,11}.

En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, ha reportado 145 casos de MAP, durante el periodo comprendido entre 1962 y 2018, solamente 4 pacientes han sobrevivido a la infección, lo que se atribuye a la rápida progresión de la patología^{5, 36}. Orrego y col. (2015), describen seis casos de EGA en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas durante el periodo comprendido entre 1994 y 2010 en Perú. Estos pacientes ingresaron por sospecha de tumor cerebral primario maligno y sarcoma orbito nasal⁹.

Según la recopilación de casos realizados en el año 2018 por Costamagna³², se evidencia que, de 3,406 casos de infección por AVL, la mayoría fueron causados por especies de *Acanthamoeba* 2,645 (77,66%); seguidos por *Naegleria* con 504 casos (14,80%); mientras que, las menores frecuencias fueron de *Balamuthia* con 224 registros (6,58%) y *Sappinia* con solo 33 casos (0,97%). Al realizar la prueba de Chi cuadrado a estos datos, se logra obtener una diferencia estadísticamente significativa ($X^2= 6891,520$ $P= 0,0001$), comprobando que, *Acanthamoeba* poseen la mayor prevalencia, posiblemente asociada a la mayor distribución en el medio ambiente, por lo que existe mayor probabilidad que este género infecte al ser humano, provocando EGA y queratitis amebiana, sin embargo, se considera que la poca detección de casos se debe a que esta ameba afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos³². Ver Tabla 2.

Tabla 2. Publicaciones a nivel mundial de detección de géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, y *Sappinia*, durante el periodo 2000-2018.

Año	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Balamuthia</i>	<i>Sappinia</i>
2018	132	32	7	1
2017	214	44	15	3
2016	2	49	16	3
2015	188	47	25	2
2014	207	4	18	2
2013	204	43	17	2
2012	161	32	8	2
2011	145	33	16	1
2010	174	32	12	2
2009	163	27	11	6
2008	137	26	12	0
2007	152	3	16	2
2006	143	25	13	0
2005	116	24	7	1
2004	131	31	11	2
2003	103	27	8	1
2002	96	2	5	2
2001	94	14	4	1
2000	83	9	3	0
Total	2,645 (77,66%)	504 (14,80%)	224 (6,58%)	33 (0,97%)

Fuente: Costamagna (2018)³².

Para orientar el diagnóstico de enfermedad causada por AVL, se debe conocer los antecedentes epidemiológicos del paciente, donde es de considerable importancia el contacto con reservorios hídricos naturales o artificiales y con tierra. Para el diagnóstico de Laboratorio es imprescindible realizar procedimientos que permitan visualizar de manera directa los trofozoítos o quistes, en muestras de LCR, secreciones faríngeas y pulmonares, lesiones en piel, raspados de córnea y

fragmentos de tejidos, según el cuadro clínico que muestre el paciente. Sin descartar, el estudio histopatológico de cortes de pulmón y cerebro obtenidos de biopsia o autopsia, que contribuyen con el diagnóstico definitivo de las patologías causadas por estos protozoos^{12,13}.

3.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

3.2.1. Diagnóstico Parasitológico

3.2.1.1. Microscopía

El examen microscópico directo es una herramienta útil para el diagnóstico de las AVL, se pueden analizar muestras de LCR, hisopados corneales, raspados y biopsias, que deben ser tomadas de forma aséptica y transportadas al Laboratorio de inmediato, siendo mantenidas a temperatura ambiente hasta el momento de su procesamiento, para evitar que las bajas temperaturas de refrigeración paralicen los trofozoítos.

El personal de laboratorio debe garantizar la esterilidad, manteniendo el cierre hermético de las jeringas, tubos o envases recolectores. Asimismo, deben adoptar las medidas de bioseguridad y utilizar prendas de protección descartables, para evitar la contaminación de las muestras, con otros microorganismos que interfieran en sobrevivencia y reproducción de las amebas^{3,12}.

3.2.1.2. Diferencias morfológicas y biológicas entre las AVL involucradas en infecciones humanas.

Para realizar un adecuado diagnóstico microscópico, es importante conocer las características morfológicas y biológicas diferenciales entre trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*, que son las amebas más frecuentemente involucradas en infecciones humanas.

Para ello se han resumido las características más importantes y de mayor utilidad para los Laboratoristas clínicos plasmándolas en la Tabla 3.

Tabla 3. Características morfológicas y biológicas diferenciales entre trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*.

Morfología y Biología	Géneros			
	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Balamuthia</i>	<i>Sappinia</i>	<i>Naegleria</i>
Trofozoítos				
Ameboides	Reproducción por fisión binaria	Reproducción por fisión binaria	Reproducción por fisión binaria	Reproducción por fisión binaria
Tamaño	10 - 60 μ (20 μ)	10 - 30 μ	45 y 76 μ	10 - 20 μ (13 μ)
Núcleo	Cariosoma central y halo claro que rodea al núcleo	Núcleo vesicular de gran tamaño	2 núcleos vesiculares de gran tamaño, opuestos con una conexión central aplanada, similar a un desmosoma	Cariosoma central y gránulos de cromatina nuclear
Citoplasma	Vacuolado	Vacuolado	Tienen una región hialina en el extremo anterior. Posee una gran vacuola contráctil que cambia de forma durante la locomoción y crestas mitocondriales tubulares.	Limpio, se pueden ver eritrocitos y leucocitos

Membrana	Lisa	Lisa	Superficie dorsal lisa, con algunas pequeñas arrugas a lo largo de los bordes de la célula	Arrugada
----------	------	------	--	----------

Pseudópodos	- Muy finos (acantópodos) - Emite varios a la vez	-Emite varios pseudópodos	- Emite solo 1 pseudópodo	- Redondeado - Emite solo 1 pseudópodo - Movimiento rápido
Movimiento	Lento	Lento	Lento	Activo
Flagelados	No existen	No existen	No existen	-Tamaño 8 a 12 μm Son piriformes -1 núcleo Poseen 2 flagelos anteriores No se reproducen
Quistes				
Forma	Poliédrica	Esférica	Esférica	Esférica o estrellada
Tamaño	10 - 25 μ	6 - 16 μ	30 - 34 μ	7 - 10 μ
Núcleo	1 núcleo	1 núcleo	Generalmente 2 núcleos, pero puede tener entre 1 y 8 núcleos	1 núcleo
Citoplasma	Finamente granular	Granulaciones finas		Granulaciones escasas
Membrana	Forma poliédrica, doble pared quística Externa: Rugosa Interna: Poligonal	Posee 3 capas	Doble	Doble: lisa y delgada
Presencia en tejido	Trofozoítos y quistes	Trofozoítos y quistes	Trofozoítos y quistes	Trofozoítos

Patología	EGA Queratitis amebiana Amebiasis cutánea	EGA Queratitis amebiana Amebiasis cutánea	EGA Queratitis amebiana Amebiasis cutánea	MAP
Afecta individuos	Inmunosuprimidos	Inmunosuprimidos	Inmunocompetentes	Inmunocompetentes
Puerta de entrada	Piel, córnea, neuroepitelio olfatorio	Piel, córnea, neuroepitelio olfatorio	Piel, córnea, neuroepitelio olfatorio	Neuroepitelio olfatorio
Cuadro Clínico	Curso subagudo (8-30 días) crónico (> 32 días)	Curso subagudo (8-30 días) crónico (> 32 días)	Curso subagudo (8-30 días) crónico (> 32 días)	Agudo, fulminante, fatal (10 días)
Incubación	> 10 días	> 10 días	> 10 días	3-7 días
Inicio	Lento	Lento	Lento	Rápido
Diseminación SNC	Alcanza el cerebro a partir de la infección en piel, ojo, pulmón, tomando vía hematogena	Alcanza el cerebro a partir de la infección en piel, ojo, pulmón, tomando vía hematogena	Alcanza el cerebro a partir de la infección en piel, ojo, pulmón, tomando vía hematogena	Directa al plexo nervioso
Afección ocular	Queratitis	Queratitis	Queratitis	No causa

Fuente: Botero (2012)¹.

Es importante resumir las claves morfológicas y biológicas diferenciales entre los 2 géneros más frecuentes: *Acanthamoeba* posee mayor tamaño, los trofozoítos miden entre 10 y 60 μ , pueden emitir varios pseudópodos a la vez, son muy finos (acantopódos) y le proveen un movimiento lento. Mientras que, los trofozoítos de *Naegleria* son más pequeños, su tamaño varía entre 10 y 20 μ , emite solamente 1 pseudópodo con el que se mueve más rápidamente, dentro de su citoplasma se pueden observar eritrocitos y leucocitos, pueden ser ameboides o flagelados, la forma amebode se reproduce por fisión binaria y la flagelar no se replica.

Los quistes de *Acanthamoeba* también son de mayor tamaño (10-25 μ) tienen una característica forma poliédrica y poseen doble pared quística, donde la membrana externa es rugosa y la interna es poligonal, por el contrario, los quistes de *Naegleria* son más pequeños, alcanzan entre 7 y 10 μ de diámetro, son esféricos, tienen una pared lisa con doble membrana.

Además, existe una técnica de diagnóstico diferencial, conocida como Prueba Flagelar, que consiste en lavar dos veces con solución tamponada la muestra que contienen trofozoítos, descartar ese sobrenadante y colocar 2 a 3 gotas de agua destilada en un tubo de ensayo estéril e incubar a 37°C durante un periodo de 2 a 4 horas, posteriormente se observarán microscópicamente, visualizando los 2 flagelos anteriores¹².

3.2.1.2. Análisis de LCR

En el análisis del LCR, se realiza el diagnóstico basándose en las diferencias morfológicas que se presentan de acuerdo con el género involucrado. Los trofozoítos y los quistes se pueden visualizar mejor, al realizar coloraciones con Hematoxilina-eosina o Hematoxilina férrica. Debe tenerse la precaución de no confundir los trofozoítos con macrófagos y los quistes con leucocitos.

En pacientes con meningoencefalitis aguda de etiología desconocida, donde no se observan bacterias, con cultivo negativo y sin respuesta al tratamiento con antibióticos, se debe pensar en la posibilidad de una infección por *Naegleria*. Mientras que, en niños, ancianos o inmunosuprimidos con meningitis crónicas o subagudas, con lesiones cutáneas u oculares, es probable que sea causada por *Acanthamoeba*, *Balamuthia* o *Sappinia*.

En el caso de infección por *Acanthamoeba* el LCR es similar al que se obtiene en encefalitis virales, pueden visualizarse tanto trofozoítos como quistes y debe a ver diagnóstico diferencial de encefalitis viral, fúngica, tuberculosis y tumores cerebrales. Por el contrario, en las infecciones por *Naegleria* el LCR similar al de una meningitis bacteriana, por lo que debe hacerse el diagnóstico diferencial, es turbio, existe pleocitosis con predominio de polimorfonucleares, aumento de las proteínas y la glucosa puede estar normal o disminuida, no se visualizan bacterias y el cultivo es negativo. La observación directa del sedimento del líquido fresco, sin refrigerar, ni congelar es útil para visualizar el movimiento de los trofozoítos, debido a que las bajas temperaturas los inmovilizan y destruyen¹³.

Simultáneamente, es conveniente realizar extendidos del sedimento del LCR, coloreados con Wright o Giemsa, donde se puede visualizar los trofozoítos y quistes con el citoplasma teñido de azul y el núcleo de rosado. La fijación con metanol y la coloración con Giemsa garantiza mayor nitidez de las estructuras morfológicas para realizar el diagnóstico diferencial. Una buena coloración es la Tricrómica, que se realiza después de fijar las preparaciones con líquido de Schaudinn, donde los quistes se tiñen de verde y en los trofozoítos se diferencia el citoplasma púrpura y cariosoma rojo.

Se ha querido resumir las características físicas, químicas y citológicas del LCR, asociando las patologías bacterianas, virales y micóticas con las producidas por las diferentes AVL, con el fin de orientar a los Laboratoristas sobre la alteración de los valores normales y los aspectos a considerar en el momento del diagnóstico. Ver tabla 4.

Tabla 4. Análisis del LCR y sus semejanzas con otras infecciones.

EXAMEN FÍSICO	
Aspecto	Normal: Transparente Líquidos claros <i>Acanthamoeba</i> , <i>Balamuthia</i> y <i>Sappinia</i> Líquido turbio: <i>Naegleria</i>
Color	Cristal de roca: (Normal) Xantocrómico: (Proteínas, Hb, Bilirrubina) Hemorragia antigua ictericia Blanquecino: (Leucocitos, bacterias) Rojizo: (eritrocitos) Punción traumática
Patológico	Aspecto: Turbio, opalescente o sanguinolento Puede existir turbidez debido a: - Presencia de microorganismos: $>10^5$ UFC - Pleocitosis: más de 200 leucocitos / μ L - Hematíes: más de 400/ μ L - Niveles elevados de proteínas
Viscosidad	Similar al agua

Densidad	1005-1008
Coagulación	Negativa: <i>Acanthamoeba</i> , <i>Balamuthia</i> y <i>Sappinia</i> (EGA) Positivo: <i>Naegleria</i> (MAP)
ANÁLISIS QUÍMICO	
pH	Valor de referencia: 7,35 – 7,40
Glucosa	- 60 -70 % adultos y niños - 75 - 85 % neonatos
Proteínas	Valores de Referencia: 15-45 mg/dL Aumentada en Inflamación, degeneración y destrucción del SNC, meningitis tuberculosa.
Lactato Deshidrogenasa LDH	Valores de Referencia: 8-50 U/L
EXAMEN CITOLÓGICO	
	Centrifugar el LCR a 1500 RPM durante 10 minutos
Células	Normal: menor o igual a 5 células/mm ³ Valores normales: Adultos: 0-5 células/ mm ³ Neonatos: 0-30 células/mm ³ Niños: 0-10 células/ mm ³
Predominio leucocitario	Linfocitos: 93-97%
	Polimorfonucleares: 1-3%
	Monocitos: 0-1%
MENINGITIS BACTERIANA Y POR NAEGLERIA	
Características del LCR	Aspecto: turbio Coagulación: puede coagular

	<p>Sangre: puede contener</p> <p>Recuento de leucocitos elevado (1000 - 5000 cel/mm³), con predominio de PMN</p> <p>Proteínas: 1,0-5,0 g/l</p> <p>Glucosa: < 0,40 g/l</p> <p>Lactato Deshidrogenasa LDH: muy elevada</p> <p>Proteína C reactiva PCR: > 200 mg/l</p>
MENINGITIS VIRAL O POR ACANTHAMOEBA, BALAMUTHIA Y SAPPINIA	
Características del LCR	<p>Aspecto: claro</p> <p>Recuento leucocitario: 50-1000 cel/mm³ con predominio de linfocitos</p> <p>Proteínas: 0,5-2,0 g/l</p> <p>Glucosa: normal o > 0,60 g/l</p> <p>Lactato Deshidrogenasa LDH: normal</p> <p>Proteína C reactiva PCR: < 20 mg/l</p>
MENINGITIS FÚNGICA	
<p>Es poco frecuente en personas sanas, el mayor riesgo lo padecen aquellos pacientes portadores de HIV, con SIDA o con cualquier cuadro inmunosupresor.</p> <p>Los agentes más comunes son:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Cryptococcus neoformans</i> • <i>Candida spp.</i> • <i>Histoplasma capsulatum</i> 	
Características del LCR	<p>Aspecto: Claro</p> <p>Células: 20 a 500 cel/mm³ con predominio linfocitos y monocitos</p> <p>Proteínas: 0,50 - 2,00g/l</p> <p>Glucosa: normal o < 0,50</p> <p>Lactato Deshidrogenasa LDH: leve aumento</p>

MENINGITIS TUBERCULOSA	
Es una complicación de la tuberculosis en la niñez. Alta morbilidad, discapacidad y muerte.	
Incremento de la frecuencia por inmunosupresión	
Características del LCR	Aspecto: Claro Recuento de leucocitos: aumentados con predominio de linfocitos y monocitos Proteínas: aumento leve a moderado Glucosa: leve descenso Lactato Deshidrogenasa LDH: Aumentada Información adicional: formación de película luego de la refrigeración

Fuente: Gertiser y col. (2015)¹³.

3.2.1.3. Análisis de muestras oculares

El análisis de las muestras obtenidas por raspado o hisopado del ojo, es particularmente útil para el diagnóstico de los casos de queratitis amebiana. Sin embargo, en algunos casos donde el infiltrado corneal es profundo e inaccesible al raspado, se puede tomar biopsia para el estudio histopatológico, empleando coloraciones como May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina, PAS, Fluorescente de Naranja de Acridina y Calco Flúor White. Cabe resaltar, que el éxito de este análisis depende de la experiencia del observador, debido a que los trofozoítos son muy similares a los queratocitos y los quistes a los leucocitos infiltrados en la córnea, pudiendo causar confusión en el diagnóstico, generando reportes falsos positivos³⁷.

Los analistas deben tener presente que en algunas infecciones la cantidad de parásitos es baja, generando resultados falsos negativos, como lo demostró Padzik, al reportar el crecimiento de *Acanthamoeba* en cultivos de muestras inicialmente negativas que habían sido diagnosticadas solamente por microscopía, por lo que se sugiere realizar confirmación mediante cultivo, pruebas inmunológicas o moleculares³⁸. En las muestras oculares y cutáneas se pueden encontrar AVL de los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*, siendo mayormente involucradas en casos de queratitis y amebiasis cutánea, que evolucionan lentamente a EGA en individuos inmunocomprometidos.

3.2.1.4. Análisis de muestras cutáneas

Las muestras de piel se procesan de manera semejante a las oculares, la forma más fácil, rápida, económica y menos invasiva es tomar raspados e hisopados de las lesiones cutáneas, fijarlos con metanol y se colorearlo con Giemsa. También, es útil cortar trozos de tejido del borde de la lesión, para realizar improntas en láminas portaobjeto que se fijan y colorean con metanol y Giemsa, respectivamente. Se prefiere tomar el tejido del borde de la lesión para que la muestra sea útil en el diagnóstico diferencial de leishmaniasis cutánea. Con esta misma muestra se pueden realizar biopsias como se describió en el análisis de las lesiones oculares.

3.2.2. Cultivo

Los cultivos resultan ser fáciles y de gran utilidad para *Naegleria* y *Acanthamoeba*, lo que no sucede con *Balamuthia*. La técnica de cultivo en medios monoxénicos, es el estándar de oro para el diagnóstico, aunque éste carece de sensibilidad y necesita un tiempo de hasta 7 días para la replicación y visualización del parásito. Es posible que se obtengan resultados falsamente negativos, debido a la falta de replicación o muerte de las amebas, como consecuencia de la cantidad de requerimientos nutricionales, contaminación con otros microorganismos o condiciones del medio de cultivo²⁴. La sensibilidad del cultivo depende de múltiples factores como el tipo y la cantidad de muestra, el tiempo desde la colecta del material hasta su procesamiento y el estadio morfológico del parásito que se sembró, porque los quistes tardan en transformarse en trofozoítos ocasionando retraso en el diagnóstico³⁷.

Para realizar los cultivos, se utilizan placas de Petri estériles, con agar no nutritivo (ANN). Una vez solidificado el agar, se coloca sobre su superficie 500 µL de una suspensión de *Escherichia coli* en solución de Page y 100 µL de la muestra, si es líquida, o un trozo de tejido sin fijar³³. Las placas sembradas se incuban a 37°C, durante 48 h, cuando se realiza la primera observación raspando con un asa de platino estéril la superficie del agar, el material extraído se homogeniza con una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjeto y se observa al microscopio óptico, con los objetivos de 10 y 40 x.

El cultivo es positivo cuando se observan trofozoítos o quistes de AVL, si permanece negativo es necesario repetir la observación cada 7 días, con el fin de asegurarse que no hubo reproducción tardía del parásito, en caso de no observar el desarrollo de AVL hasta los 15 días

desde la siembra del cultivo, se puede reportar, como negativo. Con las muestras que resultan positivas, se realiza el estudio morfológico de las cepas aisladas, se observa la forma de los pseudópodos, la emisión de flagelos, las características del citoplasma y el movimiento de los trofozoítos³³.

3.2.2.1. Solución de Page

Es una solución en la que se deja crecer *E. coli* para posteriormente ser agregada al medio de cultivo para su enriquecimiento y hacer posible el posterior aislamiento de las AVL. Según Fierro y col., (2019), las sales empleadas para la preparación de la solución se deben disolver en 900ml de agua bidestilada, manteniendo el orden indicado en la Tabla 5. Se recomienda disolver el cloruro de calcio en un matraz aparte para asegurar su completa disolución, mantener agitación constante y de ser necesario preparar una solución madre a una concentración de 50x debido a las cantidades tan pequeñas de sales, debe ser mantenida en refrigeración (4-8°C) hasta el momento de su uso¹².

Tabla 5. Preparación de solución Page.

Cloruro sódico	120 mg
Sulfato magnésico (MgSO ₄ .7H ₂ O)	4 mg
Fosfato sódico, dibásico (Na ₂ PO ₄ H)	142 mg
Fosfato potásico monobásico (KPO ₄ H ₂ O)	136 mg
Cloruro cálcico (CaCl ₂ .2H ₂ O)	4 mg
Agua bidestilada	1000 ml

Fuente: Fierro y col. (2019)¹².

3.2.2.2. Cultivo axénico (Medio BM-3)

Esta técnica es empleada con mayor frecuencia para el aislamiento de *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, en especial cuando se quiere aislar de muestras de LCR, piel o cerebro. Tiene la particularidad de poseer una gran cantidad de suplementos dentro de sus componentes y se recomienda reemplazarlo cada 3 días para *Balamuthia* y 5-7 días para *Acanthamoeba*.

3.2.2.1. Procedimiento

La solución de Page debe ser sacada de la nevera para que adquiera temperatura ambiente, en caso de almacenar esta solución concentrada (10x, 50x), se diluye con agua bidestilada estéril hasta 1x (solución de uso). Disponer, en un tubo estéril, 1 ml de la solución para emulsionar 12 colonias de un cultivo reciente (18-24 h) de *E. coli* (o *Enterobacter aerogenes*), hasta obtener una turbidez media y homogénea.

Permitir que las placas de Petri o el tubo con el medio de agar no nutritivo tomen temperatura ambiente. Con la ayuda de una varilla de vidrio, fragmentar los recortes corneales en un recipiente, cuidando siempre la esterilidad, emulsionar con 0,5-1 ml de solución de Page, dependiendo de la cantidad de muestra, que normalmente es escasa y también, debe ser inoculada en medios adecuados para el aislamiento de bacterias.

Con un asa bacteriológica extender en la placa o por la cuña del medio inclinado 0,2 ml de solución de Page con *E. coli*. Posteriormente, sembrar el cultivo utilizando una pipeta Pasteur estéril, añadiendo un par de gotas de la solución de Page con la muestra de tejido disgregada o el LCR, en el centro de la placa o dejándolo resbalar por el plano inclinado del tubo o sembrando directamente del hisopo. Cerrar de inmediato la placa con adhesivo poroso o el tubo con tapa roscada, sin cerrarla herméticamente, para permitir una la aireación y luego, incubar en estufa manteniendo temperaturas entre 35-37°C¹².

3.2.3. Diagnostico Inmunológico

El organismo humano crea defensas contra los parásitos, sin ser la excepción las AVL. Ante su ingreso al cuerpo de personas inmunocompetentes, el sistema inmunológico se activa, siendo posible medir este complejo antígeno-anticuerpo, basado en la reacción de enlace inmunológico, constituyendo un método de diagnóstico eficaz⁵. Sin embargo, en individuos

inmunodeprimidos, este mecanismo se encuentra inactivo, constituyendo una desventaja al tratar de realizar un inmunodiagnóstico.

La unión Ag-Ac es un proceso reversible en el que están involucradas interacciones no covalentes, dentro los métodos de interacción primaria destacan: las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta y la citometría de flujo, así como, inmunolectroforesis y ELISA, con anticuerpos mononucleares que han permitido la diferenciación de especies, siendo posible caracterizar especies de *Naegleria* que mostraban poca o ninguna reacción cruzada con especies de *Entamoeba* y *Acanthamoeba*⁶.

Se ha establecido, que el suero humano contiene anticuerpos de tipo IgM e IgG para las especies de *Acanthamoeba*, sean patógenas o no, y se ha verificado que el 50 a 100% de la población humana tiene anticuerpos para *Acanthamoeba* y *Ballamuthia* sin presentar reacción cruzada con ninguna otra especie de ameba^{19, 33}.

3.2.4. Diagnóstico Molecular

Entre las técnicas del método molecular que se han empleado para la detección de AVL están: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (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^{19,24}.

La más utilizada de estas técnicas ha sido la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por su gran sensibilidad, especificidad y rapidez. El gen 18s rRNA es parte de una unidad ribosómica repetitiva que se encuentra en múltiples copias dentro de la célula, se estima que *Acanthamoeba* tiene aproximadamente 600 copias de la unidad de repetición ribosómica. Este gen ha sido ampliamente estudiado en amebas de vida libre, permite la clasificación de especies y genotipado. En base a la secuenciación del gen 18s rRNA por técnicas moleculares se han podido identificar varios genotipos como T1, T2, T3, T4, etc. El genotipo T4 es el mayormente reportado como agente causal de infecciones amebianas y es considerado el más patógeno³⁹.

3.2.5. Algoritmo de diagnóstico con los diferentes métodos y técnicas utilizados, para identificación de AVL en patología humana

Amebas de vida libre

Acanthamoeba

Trofozoíto: 1 núcleo con cariosoma central, citoplasma finamente granular, tamaño entre 10 a 60 μm , posee pseudópodos afilados (acantópodos)

Quiste: 1 núcleo con cariosoma central, forma poliédrica, miden entre 10 a 25 μm .

Balamuthia

Trofozoíto: 1 núcleo vesicular de gran tamaño, miden entre 10-30 μm .

Quiste: 1 núcleo vesicular de gran tamaño son esféricos, miden entre 6-16 μm . Poseen pared celular

Sappinia

Trofozoíto: 2 núcleos vesiculares de gran tamaño, mide entre 45-76 μm , posee membrana superficie lisa.

Quiste: 2 núcleos, son esféricos, miden entre 30 - 34 μm , pero puede tener entre 1 y 8 núcleos, poseen doble pared.

Naegleria

Trofozoíto: 1 núcleo con cariosoma central emite 1 pseudópodo, mide entre 10-20 μm , posee la membrana celular arrugada

Trofozoíto flagelado: es piriforme, emite 2 flagelos por el extremo anterior y no se multiplica

Quiste: 1 núcleo, son esféricos y miden entre 7-10 μm .

Patolog

Queratitis Amebiana (QA)

Amebiasis Cutánea

Encefalitis Granulomatosa a Amebiana (EGA)

Encefalitis Granulomatosa a Amebiana (EGA)

Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP)

Métodos de diagnóstico de laboratorio

Diagnóstico Parasitológico

Microscopía:

- Examen Directo en LCR.
- Tinción de sedimento del LCR e improntas de tejido con Giemsa o May Grunwald-Giemsa.
- Coloraciones de cortes histológicos con May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina, PAS, Fluorescente de Naranja de Acridina y Calco Flúor White

Cultivo:

De LCR, tejido, hisopados o raspados en Agar no nutritivo enriquecido con *E.coli*, en solución de Page. Incubar en estufa a 35-37°C durante al menos 15 días.

Diagnostico Inmunológico

Inmunoanálisis:

mediante técnicas:

- Inmunofluorescencia Directa e Indirecta.
- Inmunolectroforesis
- Citometría de Flujo

Diagnóstico Molecular

PCR:

mayor sensibilidad, especificidad y rapidez.

Para el desarrollo de la investigación, se ha seleccionado autores que describan en sus estudios, casos de patologías por AVL, en humanos y técnicas de diagnóstico de laboratorio clínico.

Goñi y col. (2015), han establecido que las AVL son organismos unicelulares que producen en el hombre enfermedades de curso diverso, desde cuadros agudos y fatales con componentes de predominio necrótico a enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa⁷.

De igual manera se mencionan que a mediados del siglo XX dejan de considerar a las amebas microorganismos inocuos y se empieza a conocer su capacidad para producir enfermedades en los seres humanos que van desde cuadros agudos hasta daños irreversibles y fatales^{12, 22}.

Por otra parte, Costamagna (2018), refiere que, en la actualidad la International Society of Parasitology, en base a las características filogenéticas separaron a las AVL patógenas en dos Grupos, *Amoebozoa* y *Excavata*, admitiendo que los protozoos descritos son agentes infecciosos primarios y oportunistas, siendo difícil su diagnóstico clínico, especialmente los que involucran al SNC y la córnea³². En concordancia con los autores citados, se puede inferir que las AVL, están consideradas como organismos patógenos, de carácter emergente en el humano, especialmente aquellas capaces de provocar daños de carácter irreversible y letal.

Carbal y col, (2016), refieren los primeros casos donde se determinó que algunas AVL podían producir enfermedad en el hombre, siendo consideradas como “agentes infecciosos facultativos emergentes”, incluyendo casos de EGA, queratitis amebiana e infecciones cutáneas provocadas por *Acanthamoeba* y MAP por *Naegleria fowleri*¹⁰.

De la misma forma Vélez y col. (2014), comprueban que *Acanthamoeba* es el género más abundante, con veinte genotipos distintos (T1-T20), siendo encontrados T4, T5, T15, T3, T2 y T11 con mayor frecuencia en ecosistemas acuáticos, naturales y artificiales. Se ha demostrado que varios de estos genotipos son causantes de queratitis y junto con *Balamuthia mandrillaris*, producen EGA e infecciones en pulmón y piel. El género *Naegleria* posee una única especie capaz de producir enfermedades al ser humano, *N. fowleri* considerada potencialmente patógena y responsable de la MAP. *Vermamoeba vermiformis* ha sido también agente causal de queratitis.

En menor proporción se encuentran los géneros *Sappinia* que causa encefalitis y *Paravahlkampfia*, causante de un único caso de meningoencefalitis²¹.

Estos resultados concuerdan con aporte de Chang y col. (2016), en su estudio “Balamutiasis centofacial: reporte de caso de una infección amebiana cutánea”. *B. mandrillaris* tiene predilección por la piel del centro de la cara, puede afectar el SNC, llevando a una EGA¹⁷. La exposición a estos organismos es probablemente común debido a su presencia en el entorno natural, sin embargo, clínicamente la infección cutánea es poco frecuente, tal vez debido al adecuado estado inmune de los pacientes o a la ausencia de lesiones en piel, mucosas o cornea que impide el ingreso de las AVL¹⁷.

En concordancia con los resultados anteriores, González (2018) refiere que, desde el punto de vista epidemiológico y sanitario las especies de *Acanthamoeba* y *Naegleria* son las más importantes, debido a su mayor prevalencia y reconocida patogenicidad, cuyo diagnóstico debe ser considerado por los laboratoristas, aunque generalmente carecen de experiencia por lo infrecuente de la patología y porque lo consideran dificultoso, se recomienda que deben capacitarse para realizarlo en la rutina del análisis de LCR o raspados corneales y cutáneos³⁶.

Cabello (2015), explica que generalmente *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*, pueden comportarse como agentes patógenos oportunistas en personas inmunocomprometidas, ya sea pacientes con SIDA, bajo terapia inmunosupresora o quimioterapia, provocando lesiones cutáneas, oculares, sinusitis y amebiosis diseminada que puede desencadenar en EGA a nivel¹⁸. Mientras que, Shyam y col. (2019), señalan que las infecciones no oportunistas, se dan en personas sanas, siendo la patología predominante la queratitis y queratoconjuntivitis amebiana, a consecuencia de traumatismo corneal, uso de lentes de contacto o contacto con agua contaminada para estos géneros o la MAP desencadenada por *Naegleria*²⁰.

En virtud de lo antes descrito, se debe considerar que cualquier persona puede infectarse cuando se encuentra expuesta a los factores de riesgo asociados a la invasión de AVL, en dependencia de su especie y género, podrán aprovechar la susceptibilidad de algunos pacientes. En otros casos concretos, valerse de lesiones tanto cutáneas y corneales. Definitivamente existen

diferentes puertas de entrada de estos protozoos al SNC, conduciendo a una inminente infección de considerable morbi-mortalidad.

Para el diagnóstico apropiado y oportuno de estas infecciones, se torna necesario comparar, la sintomatología presentada por el paciente, con la expuesta en la literatura, con el fin de orientar, bajo que metodologías diagnósticas de laboratorio, se podría detectar la presencia de AVL en el organismo humano, de esta manera algunos autores detallan, los medios de identificación por patologías, como:

Cabello (2015), afirma que la EGA, presenta un cuadro evolutivo subagudo y crónico, con un periodo de incubación de dos semanas, tiempo en el cual se presentan tejido necrosado, abscesos debido a la presencia de trofozoítos dentro de la masa encefálica¹⁸. Shyam y col. (2019), afirman que dependiendo del lugar afectado se podrán evidenciar diferentes signos y síntomas a nivel neurológico, dentro los cuales se tiene: aumento de la presión intracraneal, parálisis de los nervios craneales, deterioro en el estado de conciencia, convulsiones, coma y muerte²⁰.

Para efectuar el diagnóstico de laboratorio de MAP, Fierro y col. (2019), refieren que en el examen directo del LCR se observa trofozoítos o quistes, y la turbidez causada por el aumento de leucocitos y proteínas. La glucosa puede estar normal o baja. Se recomienda reconfirmar el diagnóstico con la siembra en Agar no nutritivo. Así como, Inmunofluorescencia Indirecta, Citometría de Flujo y PCR siendo este último el método de elección, debido a que es rápido y sensible para la identificación del parásito¹². Las improntas realizadas con cortes de tejido o los frotis del sedimento del LCR, se pueden teñir con May Grunwald-Giemsa, HematoxilinaEosina, Naranja de Acridina o Calco Flúor White, para facilitar la visualización⁴⁰.

Con relación a la queratitis y queratoconjuntivitis, Maffrand y col.²³, coinciden en la descripción de *A. culbertsoni*, *A. castellani*, *A. hatchetti* y *A. quina* como especies de *Acanthamoeba* que pueden producir estas patologías. Por otra parte, Hasby (2019), afirma que, tras la infección, se origina un cuadro progresivo de necrosis, en la córnea y la conjuntiva³⁰.

El diagnóstico de laboratorio para esta patología involucra 5 metodologías, descritas por varios investigadores comprobadas a través de estudios experimentales:

1) Arnalich y col. (2019), indican que la observación directa a través de microscopia es la más común y la más empleada para las muestras de raspado corneal debido al bajo costo y rapidez en el diagnóstico¹⁹. Sin embargo, si las posibilidades del Laboratorio lo permiten, debe realizarse cultivo o PCR para reconfirmar el diagnóstico

2) Abente y col. (2019), prefieren los cultivos de LCR y raspados corneales, aclarando que se realizan en medios con agar no nutritivo, para inhibir la proliferación bacteriana y fomentar la amebiana²⁴. También, es conveniente la reconfirmación mediante técnicas moleculares.

3) Fierro y col. (2019), describen que las tinciones que se utilizan más frecuentemente en los cortes histológicos son: May Grunwald-Giemsa; Hematoxilina-Eosina; PAS porque colorean de color rojo la pared quística, y por último la tinción Fluorescente de Naranja de Acridina o Calco Flúor White, que tiene afinidad por la celulosa del quiste¹².

Para realizar el diagnóstico de la infección por AVL, los casos deben valorarse con criterio epidemiológico, relacionando el antecedente de exposición al agua y tierra contaminadas, con la clínica del paciente. Esto con el objetivo, de escoger la metodología diagnóstica, más apropiada según las lesiones que presenten los pacientes y las posibilidades del Laboratorio donde se realizará el diagnóstico. El examen directo del LCR no muestra una gran sensibilidad, por lo que se sugiere realizar PCR por mayor sensibilidad y especificidad en la confirmación de los resultados⁴¹.

Al menos un Laboratorio de referencia en cada país, donde se procesan muestras biológicas aplicando técnicas de Biología Molecular, deben estar preparados, para realizar PCR donde se detecte ADN de los diferentes géneros de AVL. Así se podría corroborar de manera inmediata el diagnóstico realizado por los analistas en diferentes provincias del país, contribuyendo de manera efectiva y eficaz en el diagnóstico, con la finalidad de evitar el fallecimiento de los pacientes.

Tabla 6. Coincidencias de autores, en la elección de técnicas de diagnóstico empleadas en la identificación de AVL, asociadas a patologías en humanos.

N°	Autores	Año	Aporte	Coincidencias identificadas
1	(Fierro y col.) (Shyam y col.)	2019 2019	<p>-Refieren que, para el diagnóstico de AVL, las muestras biológicas más recomendables son el LCR y el tejido (biopsias), que deben ser tomadas de forma aséptica, transportadas y mantenidas a temperatura ambiente hasta el momento de su procesamiento.</p> <p>-En la observación microscópica directa del LCR, se suele encontrar, un aumento de leucocitos, hematíes, además de trofozoítos y quistes. La visualización de los parásitos es importante como criterio morfológico para la clasificación a nivel de género.</p> <p>-En el cultivo, al realizar la siembra de tejido y LCR en ANN, se identifican inicialmente trofozoítos y luego, formas flageladas (solamente en el caso de <i>Naegleria</i>) y quistes debido al agotamiento de los nutrientes.</p>	2
2	(Schuster y col.) (Costamagna)	2016 2019	<p>- El diagnóstico de EGA suele ser dificultoso por la similitud con afecciones virales y micóticas, así como, por la falta de experiencia de la mayoría de los analistas.</p> <p>-En la EGA, por <i>Acanthamoeba</i> y <i>B. mandrillaris</i>, es útil el inmunodiagnóstico mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales sobre el material de la biopsia. Sin embargo, la mejor técnica de diagnóstico es la PCR.</p> <p>- Las improntas realizadas con cortes de tejido infectado o frotis de</p>	2

			sedimento LCR, se pueden teñir con May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina; que permite la identificación de los quistes y de los trofozoítos, tinción de PAS que colorea de rojo la pared quística, y por último la tinción Fluorescente de Naranja de Acridina o Calco Flúor White, que tiene afinidad a la celulosa del quiste, para facilitar su visualización.	
3	(Vélez y col.) (Cabello) (Gertiser y col.)	2014 2015 2015	Los autores han definido características morfológicas y biológicas que contribuyen al diagnóstico de laboratorio: - <i>Naegleria</i> , observación directa del LCR con pleocitosis, polimorfonuclear, presencia de trofozoítos sin quistes en el tejido cerebral. - <i>Acanthamoeba</i> , rara vez se visualizan los trofozoítos en el LCR en fresco, los quistes se ven en el tejido cerebral. En el tejido corneal en cambio se suele identificar trofozoítos y quistes. - <i>Balamuthia</i> , bajo microscopia, se encuentra, pleocitosis, polimorfonucleares, glucosa normal en el LCR, quistes en el tejido cerebral.	3
4	(Forbes) (Arnalich) (Abente)	2014 2019 2019	-La muestra para el cultivo 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 visualizar las amebas. -Los investigadores han utilizado métodos de diagnóstico no	3 5

			<p>morfológicos, para la clasificación taxonómica de las AVL, causantes de patologías humanas, 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.</p> <p>-Actualmente se ha desarrollado un método más prometedor, el cual analiza la secuencia de ARN 18S ribosomal del ADN (ADNr 18S).</p> <p>-Recientemente se ha desarrollado una PCR para el diagnóstico de <i>Acanthamoeba</i> que puede ser realizado en LCR, tejido cerebral y otros tejidos. Resultados positivos se obtienen de tejido, pero estas pruebas tienen limitaciones en su sensibilidad y reproducibilidad.</p>	
	(Costamagna) (Maffrand)	2018 2019	<p>-La inmunidad humoral y la activación del complemento parecen ser los mecanismos de defensa primarios frente a la infección por <i>Acanthamoeba</i> spp.</p> <p>-Los principales anticuerpos séricos son de clase IgM y IgG. Ambos anticuerpos y el complemento promueven el reconocimiento de la AVL por células fagocíticas.</p> <p>-Las amebas son destruidas por los neutrófilos, los cuales son activados por linfoquinas que aceleran la combustión celular y generan enzimas lisosomales.</p> <p>-Las inmunoglobulinas del suero no difieren significativamente entre</p>	2

			pacientes con queratitis o EGA y sujetos saludables; pero los niveles de IgA específicos para <i>Acanthamoeba</i> en lágrimas fueron significativamente menores en pacientes con queratitis	
--	--	--	---	--

Según el estudio bibliográfico realizado sobre el diagnóstico de laboratorio en las AVL que causan infección en los humanos, los géneros responsables que provocan daños en el SNC son *Acanthamoeba* que causa patología de encefalitis granulomatosa amebiana, queratitis amebiana puede provocar pérdida de la visión permanente si no se trata inmediatamente, amebiosis cutánea (AC), *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia* causan patológica de encefalitis granulomatosa estas se diferencian por su pared quística y por último *Naegleria fowleri* que provoca meningoencefalitis amebiana primaria, la Tabla 6, permite observar que el examen microscópico es utilizado con mayor frecuencia por su rapidez y sencillez, las tinciones más utilizadas son May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina, permiten la identificación de los quistes y trofozoítos, la tinción de PAS que colorea la pared quística, y por último la tinción Fluorescente de Naranja de Acridina o Calco Flúor White, que tiene afinidad a la celulosa del quiste, facilita su visualización ayudando al diagnóstico.

Tabla 7. Técnicas utilizadas en el de diagnóstico de amebas de vida libre (AVL), publicadas durante los últimos 5 años.

AÑO	LUGAR	Autores	Técnicas de diagnóstico de AVL		
			<i>Acanthamoeba</i> (EGA) (QA)	<i>Naegleria fowleri</i> (MAP)	<i>Balamuthia mandrillaris</i> (EGA)
2020	Costa Rica	Baraquiso y col.		Examen microscópico LCR PCR	

2019 Ecuador	Fierro y col.	Examen microscópico LCR, cultivo, PCR	Examen microscópico LCR Tinción y prueba flagelar	
2017 Venezuela	Wagner y col.	Examen microscópico LCR, Cultivo, PCR	Examen microscópico LCR, Cultivo, PCR	Examen microscópico LCR, Cultivo, PCR
2017 Italia	Pinna y col.	Examen microscópico LCR, Cultivo, PCR	Examen microscópico LCR, Cultivo, PCR	
2016 Perú	Minetto y col.	Examen microscópico LCR, cultivo	Examen microscópico LCR, cultivo	Examen microscópico LCR, cultivo
2019 Argentina	Costamagna y col.	Cultivo, PCR	Cultivo, prueba flagelar y PCR	

Al contrastar la información publicada por los diferentes investigadores, se evidencia que el examen microscópico del LCR, es una de las técnicas más utilizadas, dentro del diagnóstico de laboratorio, lo cual permite realizar el análisis de manera inmediata, a bajo costo y con la ventaja del movimiento de los trofozoítos, que facilita la detección.

Las tinciones (May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina, tinción de PAS, tinción Fluorescente de Naranja de Acridina o Calco Flúor Whiteal) permiten la identificación de los quistes y trofozoítos de AVL, sin embargo, se requiere de las baterías de tinción y de un entrenamiento en la visualización para el reconocimiento de trofozoítos y quistes.

El medio de cultivo en Agar no nutriente con solución de Page con *E. coli*, es relativamente económico y fácil de realizar en un Laboratorio que disponga de la infraestructura para realizar diagnóstico microbiológico, permite el aislamiento de *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*, en especial en muestras de piel o cerebro.

La prueba flagelar permite la identificación de *Naegleria*, es poco utilizada, sin embargo, es recomendable, en vista de la fácil y económica que resulta para cualquier Laboratorio, comprobar la presencia de trofozoítos flagelares que solamente los presenta *Naegleria*.

Finalmente, la PCR es la técnica molecular utilizada para la confirmación, siendo la más recomendada por su especificidad, sensibilidad y rapidez, aunque con la limitante que pocos Laboratorios disponen de la infraestructura para llevar a cabo pruebas moleculares.

3.2.5. Tratamiento

Aunque el tratamiento no se encuentra entre los objetivos planteados en la investigación, se consideró oportuno recopilar la información existente.

Hasta ahora, no se ha llegado a un consenso sobre el tratamiento de las afecciones del sistema nervioso por AVL. La anfotericina B ha demostrado efectividad *in vitro* y en infecciones experimentales de animales con diferentes cepas de *Naegleria*, y en seres humanos se describe la efectividad en casos de MAP aplicando dosis de 0,25 a 1 mg/kg/día, por vía sistémica e intratecal simultáneamente.

Los fármacos antiparasitarios que se utilizan contra *Entamoeba histolytica*, como emetina y metronidazol, no han resultado adecuados contra *Naegleria*, la mayoría de los casos tratados con estos medicamentos han sido fatales y son escasas las publicaciones en las que se confirmen la efectividad terapéutica. El tratamiento con miconazol, rifampicina, sulfisoxazol, por vía parenteral e intratecal, tampoco ha dado resultado. Incluso se ha probado la inoculación de anticuerpos monoclonales anti-*Naegleria*, sin resultados alentadores.

Para la EGA, se ha ensayado con propamidina, pentamidina, dibromopropamidina, ketoconazol, paromomicina, neomicina, 5-fluorocitosina y anfotericina B, sin embargo, no existe buen pronóstico, pues considerable número de casos han sido informados durante la autopsia.

El tratamiento de la queratitis ha sido exitoso con gotas oftálmicas de: isetionato de pentamidina, clotrimazol y neomicina. No se recomienda la aplicación de esteroides y en casos extremos, cuando la infección se encuentra asociada con bacterias ha sido necesario realizar procedimientos quirúrgicos como el debridamiento y la queratoplastia. Para evitar la contaminación de los lentes de contacto, se utiliza peróxido de hidrógeno¹.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de la presente investigación son:

Los géneros de amebas de vida libre más importante en las infecciones humanas son en primer lugar *Acanthamoeba*, debido a la mayor incidencia de encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y queratitis amebiana (QA) en los pacientes. En segundo lugar, se encuentra *Naegleria fowleri*, como agente causal de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), con desenlaces fatales en la mayoría de los casos y por último *Balamuthia mandrillaris*, causando encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) con menores prevalencias. Patologías que, al no ser diagnosticadas oportunamente, ni tratadas de manera adecuada, pueden llevar al fallecimiento del paciente.

La prevalencia de amebas de vida libre en humanos muestra que *Acanthamoeba* alcanzó un total de 2,645 casos, para *Naegleria fowleri* se recopilaron 504 casos, mientras que, solamente se diagnosticaron 224 casos de *Balamuthia mandrillaris* y 33 de *Sappinia*.

El diagnóstico parasitológico de AVL se realiza principalmente mediante la visualización de trofozoítos o quistes en el Examen Directo del LCR de pacientes con alteraciones del SNC y en raspados o hisopados de lesiones cutáneas y oculares, esta técnica ofrece resultados inmediatos que contribuyen a un diagnóstico precoz, aunque requiere la experiencia del analista.

El cultivo se emplea como técnica de diagnóstico complementaria porque permite la reproducción y posterior observación de los trofozoítos, con los que se puede realizar una diferenciación a nivel de género. No obstante, también requiere la experiencia microscópica del analista, así como, la adecuada manipulación de los cultivos, debido a que se ha observado que cambios en los medios y técnicas de siembra influyen en el tamaño y

morfología de las AVL o causan la inhibición de la reproducción por falta de nutrientes o contaminación con otros microorganismos.

Las tinciones de cortes histológicos con May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-Eosina, PAS, Fluorescente de Naranja de Acridina y Calco Flúor White, contribuyen en el diagnóstico, pero no están al alcance de todos los Laboratorios de rutina, requieren de la experiencia del analista en el reconocimiento de estructuras parasitarias inmóviles.

El inmunodiagnóstico mediante Inmunofluorescencia Directa e Indirecta, Inmunoelectroforesis y Citometría de Flujo, muestran una baja sensibilidad, se han utilizado por algunos investigadores, pero han sido sustituidas por las técnicas moleculares.

La técnica, de PCR muestra gran sensibilidad, especificidad y rapidez, además se requiere poca cantidad de muestra. Por lo que se concibe como la técnica diagnóstica más apropiada para generar una identificación específica del patógeno.

Se diseñó un algoritmo de diagnóstico con los diferentes métodos y técnicas utilizados, a partir de la información obtenida en documentos suscritos, para que los laboratoristas clínicos dispongan de una guía para realizar el análisis.

Es importante incorporar la detección de AVL en casos sospechosos, para contribuir con el diagnóstico oportuno, haciendo posible la instauración del tratamiento adecuado que contribuya en la disminución de la mortalidad de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Botero D, Restrepo Marcos. Parasitosis Humanas, Quinta Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín Colombia. 2012. 457pp
2. Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae Scielo.Rev. Salud y Ambiental: [Internet]; 2017febrero [Citado 4 septiembre 2020]; 24(2): p. 264260. Disponible en:

file:///C:/Users/pc/Downloads/Human%20infections%20caused%20(2).pdf
3. Reyes C, Alarcón F. Amebas de vida libre en fuentes de agua natural del municipio de Turbaco [Internet]. [Medellin]: Universidad de San Buenaventura. Facultad Ciencias de la Salud. Biblioteca digital USB; Tesis de Licenciatura. 2015 octubre. [citado 2020 Julio 9]. Disponible en:

[http://bibliotecadigital.usb.edu.co/bitstream/10819/3168/1/Amebas de vida libre en fuentes_ Carbal Luisa_2016.pdf](http://bibliotecadigital.usb.edu.co/bitstream/10819/3168/1/Amebas%20de%20vida%20libre%20en%20fuentes_Carbal%20Luisa_2016.pdf)
4. Naveed A, Timothy O. Brain-Eating Amoebae: Predilection Sites in the Brain and Disease Outcome. Rev. American Society for Microbiol. Journal of Clin. Microbiol; 2017 Julio [citado 2020 agosto 22];7(55): p. 1989-1996. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/55/7/1989.full.pdf>
5. Benito M, Plante D, Fernández T, Gómez J. Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Rev. de Salud Ambient. 2018 junio [Citado 27 septiembre 2020]; 18(1): p. 69-77. Disponible en file:///C:/Users/pc/Downloads/892-4161-1-PB.pdf
6. Uribarren T. Estudio morfológico de *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamutia*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina [internet]. Universidad Autónoma de México. Tesis de Licenciatura 2016. [citado 2020 septiembre 10]. Disponible en: http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=1549.
7. Goñi M, Clavel A, Fernández M. Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. España: Facultad

- de Medicina Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad De Zaragoza; [Internet]; Tesis Doctoral 2015. [citado 2020 septiembre 30]. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/30662/files/TESIS-2015-023.pdf>
8. Democrática R. Niño de Arenales, primera víctima del país de ameba come cerebro Diario Junín Democracia Argentina. [Internet].; 2017 [citado 2020 septiembre 13]. Disponible en: <https://www.diariodemocracia.com/locales/junin/179905-niño-arenalesprimera-victima-país-ameba-come-cere/>.
 9. Orrego E, Casavilca S, Rodríguez F, Pritt B. Amebiasis del sistema nervioso central reporte de seis casos en el Perú. Revista de Medicina Experimental y Salud Publica: [Internet]; 2015 julio [Citado 4 septiembre 2020]; 32(3):591-595. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n3/a26v32n3.pdf>
 10. Carbal L, Foen L, Morales M, Orozco M. Free-living amoebae isolated from surface water in the municipality of Turbaco, Bolívar, Colombia. Revista Cubana de Medicina Tropical: 2016 [Citado 10 septiembre 2020]; 68(1):59-69. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmedtro/cmt-2016/cmt161f.pdf>
 11. Pertuz S, Jiménez. Amebas de vida libre potencialmente patógenas en la bahía de Maracaibo (Venezuela). Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Revista Internacional de Biología Universidad del Zulia, Maracaibo Venezuela [Internet]. 2016 agosto; [Citado 10 septiembre 2020]; 50(2): p. 102-111. Disponible en: <file:///C:/Users/pc/Downloads/PertuzyNairoArticulodeamebas.pdf>
 12. Fierro I, Lalaguaña C, Pico A. Determinación de *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri* mediante un análisis fenotípico en aguas termales de la provincia de Pichincha- Ecuador. Facultad Ciencias Químicas. [Internet]. [Quito]: Universidad Central del Ecuador; Tesis de Licenciatura 2019 agosto. [citado 2020 agosto 22]. Disponible en: <http://T-UCE-008CQU-193.pdf>
 13. Gertiser M, Visciarelli E, Costamagna S. “Aspectos biológicos y epidemiológicos de Amebas de Vida Libre aisladas en la República Argentina, con énfasis en *Acanthamoeba* spp. Facultad de Bioquímica [Internet]. [Bahía Blanca-Argentina]: Universidad Nacional del Sur. Tesis Doctoral;2015 octubre. [citado 2020 agosto 30]. Disponible en: [file:///C:/Users/pc/Downloads/Tesis-GertiserML%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/pc/Downloads/Tesis-GertiserML%20(2).pdf)

14. Claire Low A, Coyne M, Jones B. *Acanthamoeba* keratitis: improving the Scottish diagnostic service for the rapid molecular detection of *Acanthamoeba* species. *Rev. Med Microbio.* 2015;64(7):682-7.
15. Reyes N. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Carlos III (IICS). Madrid [Internet]2015. [citado 2020 julio 02]. Disponible en: https://www.comunidad.madrid/sites/default/files/doc/sanidad/epid/protocolos_nacionales_renave.pdf
16. Rodríguez A, Morales J. Meningoencefalitis Amebiana Primaria y Amebas de Vida Libre. *Journal of Clinical Microbiology* 2019; 51(19):51-56.
17. Chang O, Liu F, Knopp E, Atis M. Centofacial *Balamuthiasis*: case report of a rare cutaneous amebic infection. *Journal of Cutaneous Pathology*. PubMed Public Health 2016[citado 2020 septiembre 30]43(10):892–897. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27251900/>
18. Cabello M, *Acanthamoeba* spp., un agente oportunista en infecciones humanas. *Rev. de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*[Internet]. 2015; [citado 2020 septiembre 30]4(511):11–32. Disponible en: https://intranet.uwiener.edu.pe/univwiener/portales/centroinvestigacion/documentacion/revista_4/1_ACANTHAMOEBA_SPP_UN%20AGENTE_OPORTUNISTA.pdf
19. Arnalich F, Lumbreras B, Martín C, Valladares B, López R, Morcillo R. Influence of *Acanthamoeba* genotype on clinical course and outcomes for patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. *Journal Clin Microbiol.* 2014;52(4):1213–1216.
20. Shyam K, Tejan N, Ghoshal U, Sharma P, Kalra SK. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Exp Parasitol* [Internet]. 2020;(citado 2020 julio 30):107788. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107788>
21. Vélez V, Zapata S. AL, Ortiz M, Trujillo M, Restrepo G, Garcés S. Reporte de caso y revisión de la literatura de caso de paciente con meningoencefalitis por amebas de vida libre. *Public Health*. [Internet].2014; [citado 2020 agosto 29]17(3): 153–159. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(13\)70722-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70722-7)

22. Sandí EA, Moreira LR. Amebas de vida libre como agentes de encefalitis en el ser humano. *Revista del Colegio de Microbiólogos Químicos Clínicos*. 2015 Julio [citado 2020 agosto 7]; 20(3): 3. Disponible en: <http://microbiologos.cr/Revistas/4.pdf>
23. Maffrand R, Pizzi R, Páez M, Tomas A, Maffrand C, Pizzi H. Queratitis por *Acanthamoeba*. Infección ocular emergente. Reporte de casos. *Revista de Salud Pública*. [Internet]. 2019 marzo; [citado 2020 septiembre 29] 23(1):41–45. Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/RSD/article/view/21129/23472>
24. Abente S, Franco I, Samudio M, Guillén R. Situación del diagnóstico de Queratitis Amebiana en Paraguay. *Revista de Salud Pública Paraguay*. 2019 Julio-diciembre [Citado 27 agosto 2020]; 9(2):58-65. Disponible en <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/12/1047140/2307-3349-rspp-9-02-58.pdf>
25. Siddiqui R. Biología y patogenicidad de *Naegleria fowleri*. *Acta Trop*. 2016 septiembre [citado 12 agosto 2020]; 164(15):375-394. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X16305897>
26. Balczun C, Scheid P. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Plos One* 2017 abril [citado 4 septiembre 2020]; 9(65): 2-15. Disponible en: [file:///C:/Users/pc/Downloads/balczun2017 \(1\).pdf](file:///C:/Users/pc/Downloads/balczun2017%20(1).pdf)
27. Schuster F, Honarmand S, Visvesvara G, Glaser C. Detection of antibodies against freeliving amoebae *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* species in a population of patients with encephalitis. *Parasitology International*. 2016;42(9):1260–5.
28. Roy S, Atkins J, Gennuso R, Kofos D, Sriram R, Hayes T. Assessment of blood–brain barrier penetration of miltefosine used to treat a fatal case of granulomatous amebic encephalitis possibly caused by an unusual *Balamuthia mandrillaris* strain. *Parasitology Research*; 2015 septiembre. [citado 2020 octubre 1]; 9(2):4431–4439. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26329128/>
29. Wagner CM, Morales J, Valladares B, Martínez E. Aislamiento y caracterización molecular de amebas de vida libre en Venezuela. Departamento de Medicina Preventiva, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología. Área de Parasitología. Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, España.

(IUETSPC); Tesis Doctoral. 2017 mayo [citado 2020 agosto 22]. Disponible en: <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=U0JH8BmrlMM%3D>

30. Hasby S, Marwa A, Khalil H. Biofilm testing of microbiota: An essential step during corneal scrap examination in Egyptian acanthamoebic keratitis cases. *Parasitology International*. [Internet]. 2018; [citado 2020 septiembre 19]67(5): 556–564 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383576917303963>
31. Benítez Azabache JC, Minetto Peralta MY, Lima García RH, “Amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín” Lima - Perú. Facultad Ciencias de la Salud. Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica [Internet] Universidad Privada Norbert Wiener; Tesis de Licenciatura 2016 [citado 08 de octubre]. Disponible en: http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/343/T061_40846697_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
32. Costamagna S. Brief review of human infections by free living amoebae in Argentina. *Revista Argentina de Parasitología*. [Internet].2018; [citado 2020 septiembre 29]7(190):7–16.
Disponible en: http://www.revargparasitologia.com.ar/pdf/RevArgParasitol_Vol7_Costamagna.pdf
33. Costamagna R, Canteros D. ¿Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) por *Naegleria fowleri*, Emergente en Argentina? *Boletín Asociación Argentina Microbiología*. 2018;20(3)26-35
34. Zamora J, Romero J. Amibas de vida libre. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Pediatría*. 2018 noviembre [Citado 4 septiembre 2020]; 10(2): 1397-1402. Disponible en: https://www.eipediatria.com/num_ants/octubre-diciembre2018/07_parasitologia.pdf
35. Majid A, Tooba M, Brandon J, Reena R, Anusorn P. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. *Plos One*. 2017 febrero [citado 02 octubre 2020]; 10(2):1-16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5315373/>
36. González M. Amebas de vida libre: detección en aguas de consumo y alimentos. Facultad Ciencias de la Salud. Repositorio Universidad de la Laguna, Tenerife-España

- [Internet]. Tesis de Maestría. 2018; [citado 2020 septiembre 22]. Disponible en: [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/10855/Amebas de vida libre detección en aguas de consumo y alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/10855/Amebas%20de%20vida%20libre%20detecci3n%20en%20aguas%20de%20consumo%20y%20alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
37. Franco Arzamendia I, Abente Acosta S, Guillén Freites R, Samudio Acevedo M. Detección de *Acanthamoeba* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en líquidos de conservación de lentes de contacto. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Asunción, Paraguay. Revista Cubana de Oftalmología. 2020 [citado 14 septiembre 2020]; 33(1):2-13. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086421762020000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
38. Padzik M, Bordón M. Diagnóstico de Queratitis Amebiana. Rev. Salud Pública[Internet]. 2019 diciembre. [citado 2020 septiembre 2]; 9(2):58-65. Disponible en: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/12/1047140/2307-3349-rspp-9-02-58.pdf>
39. Bonilla-Lemus P, Caballero Villegas AS, Carmona Jiménez J, Lugo Vázquez A. Ocurrencia de amebas de vida libre en arroyos de la Cuenca de México. Revista Experimental de Parasitología 2014 julio [citado 30 septiembre 2020]; 145(29):28-33. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0014489414001702?token=0A7DFD72A7554096A145F25111DF5AF9FF00B3D48924679787E0A524D526B673CAB54B09BC8565579F197A57488630DE>
40. Baraquiso M, Bonilla L, Mendelewicz A. Diagnóstico Microbiológico. Amebas de vida libre Meningoencefalitis Amebiana Primaria. Revista Ciencia y Salud: Integrando Conocimientos. [Internet]; 2020 agosto [Citado 02 septiembre 2020]; 4(4): 132-143. Disponible en: <http://revistacienciaysalud.ac.cr/ojs/index.php/cienciaysalud/article/view/190/252>
41. Pinna A, Porcu T, Boscia F, Cano A. Free-Living Amoebae Keratitis. Cornea. 2017 julio [citado 06 octubre 2020]; 36(7):785-789. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28486311/>

ANEXOS

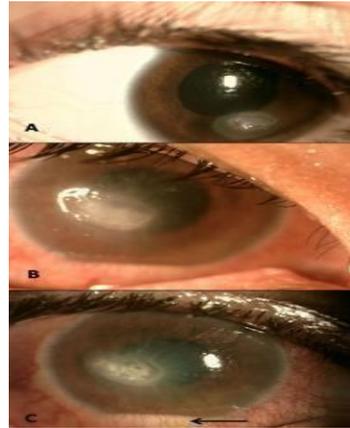


Figura 1. A, B, C Queratitis por *Acanthamoeba*

Fuente: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383576917303963>



Figura 2. A y B Lesiones cutáneas centro faciales por *Acanthamoeba* **Fuente:**

<http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sciarttext&pid=S012393922016000200009>

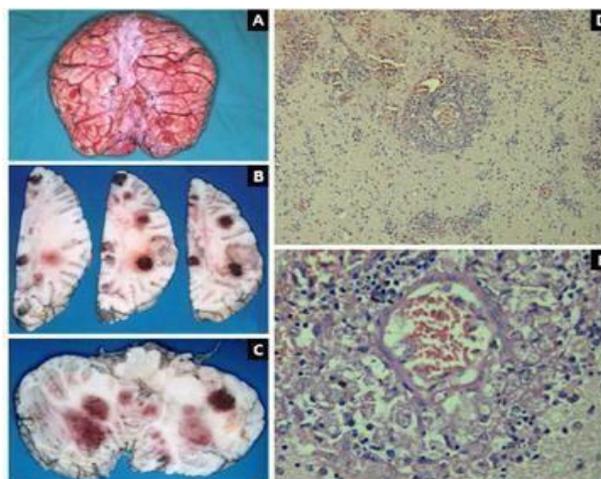


Figura 3. A-E Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)

Fuente: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/1697/1780>

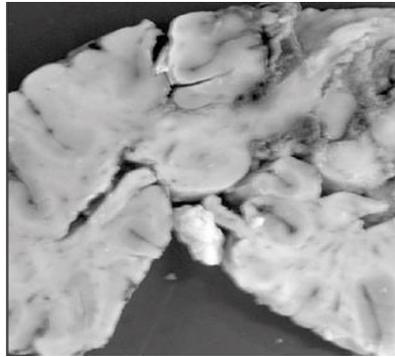


Figura 4. Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP)

Fuente: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004282X2006000600034

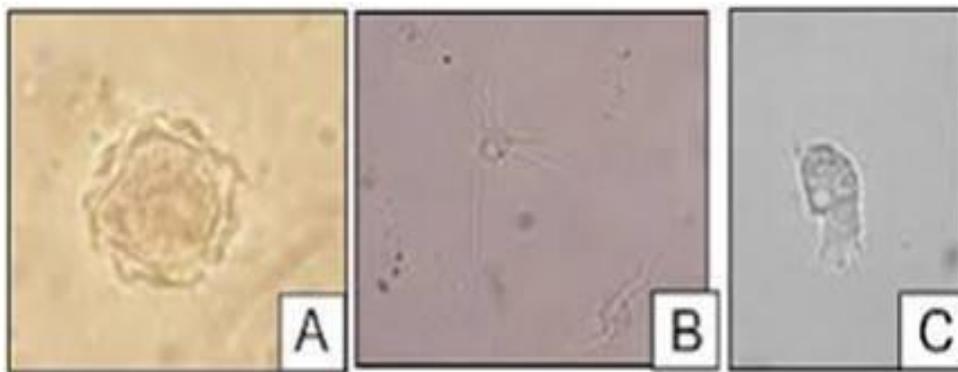


Figura 5. A quistes, B y C Trofozoítos de *Acanthamoeba*

Fuente: <http://siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/114588>

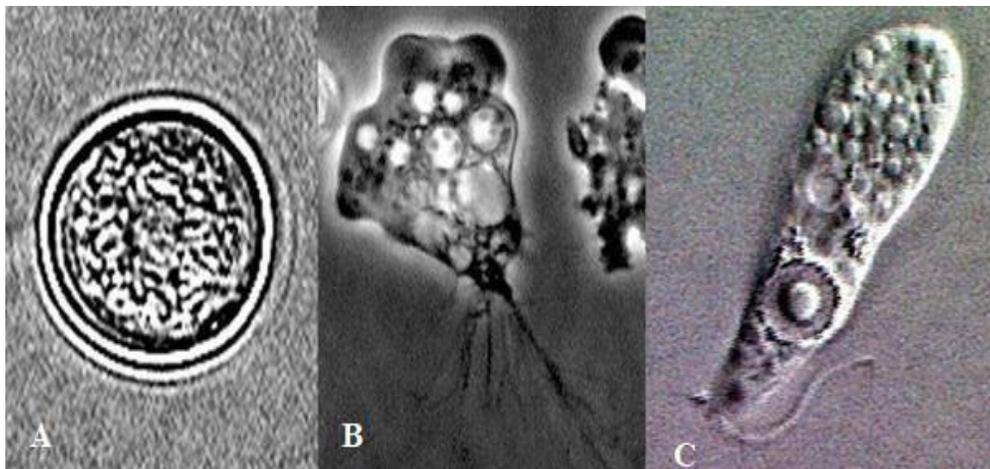


Figura 6. A. Quiste, B. Trofozoíto flagelar, C. Trofozoíto ameboide de *Naegleria fowleri*

Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Schizopyrenida#/media/Archivo:Naegleria_fowleri_life cycle_ sta ges.JPG](https://es.wikipedia.org/wiki/Schizopyrenida#/media/Archivo:Naegleria_fowleri_life_cycle_sta ges.JPG)

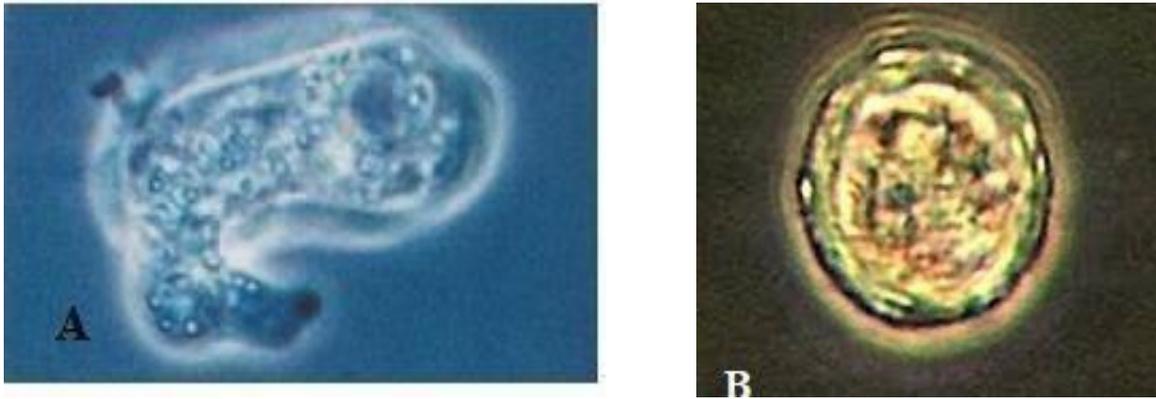


Figura 7. A Trofozoítos, **B** quistes de *Balamuthia mandrillaris*

Fuente:

https://www.google.com/search?q=quistes+de+Balamuthia&rlz=1C1CHBD_esEC923EC924&sxsrf=ALeKk02RrAEKMvynhEUNpw9vsiP_GxBbUg:1604934452691&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjAt8Lf3vXsAhWlrFkKHWi7DbYQ_AUoAXoECAQQA&biw=1366&bih=625#imgrc=vVnUT532FYXgZM

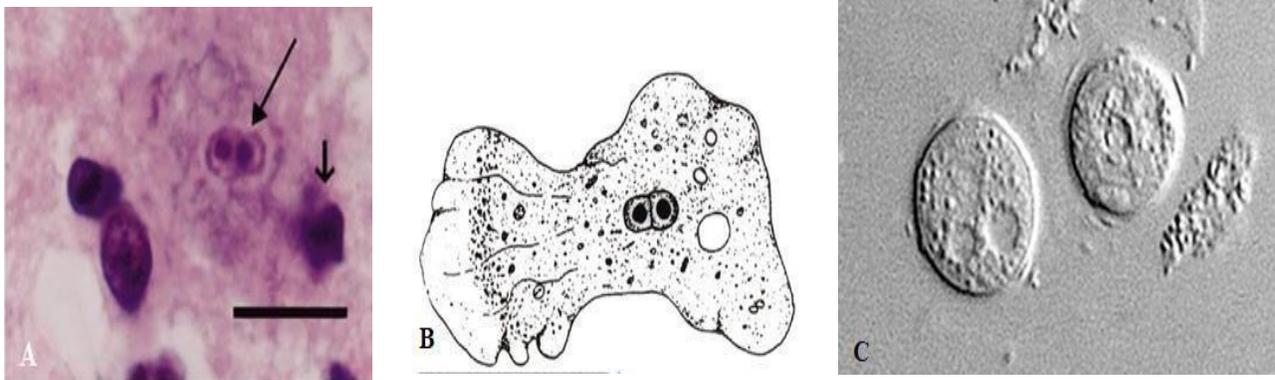


Figura 8. A Trofozoíto de *Sappinia diploidea*, **B** dibujo donde se visualizan las estructuras del trofozoíto, **C** quistes

Fuente: Figura A y B <https://www.semanticscholar.org/paper/Neuropathological-andUltrastructural-Features-of-GelmanPopov/89edae318b20abed8c281e82c2bc83cef0d07faa/fig> **Fuente: Figura C** <https://www.cdc.gov/parasites/sappinia/index.html>

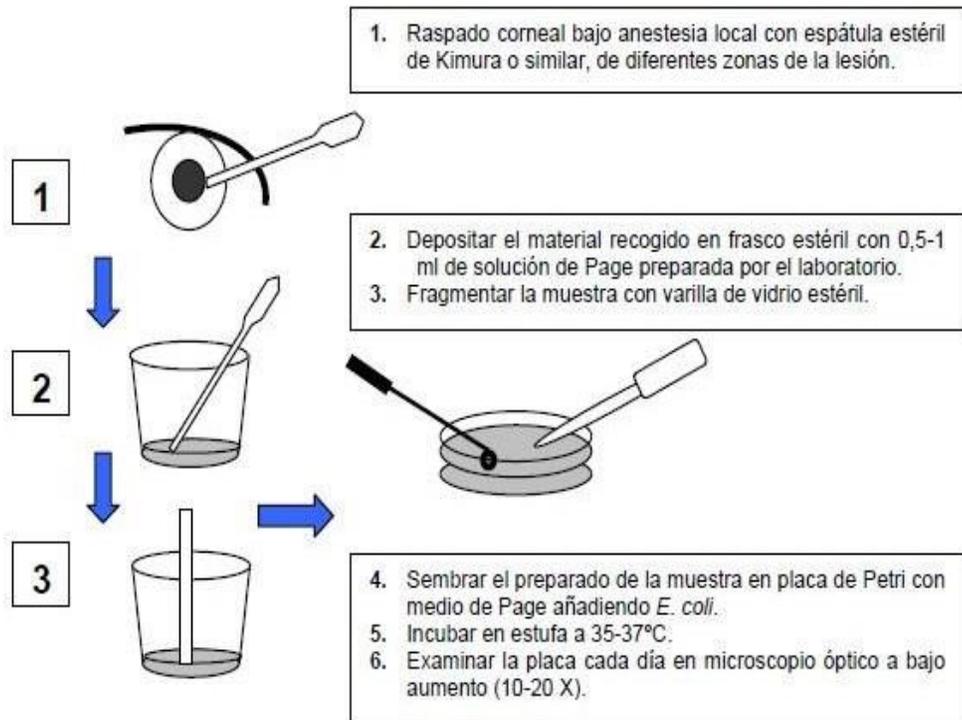


Figura 9. Esquema del cultivo de raspado corneal para la detección de AVL

Fuente: <http://downloads.hindawi.com/journals/ipid/2009/251406.pdf>