

Encefalitis por amebas de vida libre: herramientas actuales para el diagnóstico y tratamiento tempranos

Free-living amoeba encephalitis: current tools for early diagnosis and treatment

Judith Mendiola Martínez^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-8009-3398>

Yanet Fresco Sampedro¹ <https://orcid.org/0000-0003-4987-1942>

Misladys Rodríguez Ortega² <https://orcid.org/0000-0001-9455-6103>

¹Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Centro de Investigaciones Diagnóstico y Referencia, Departamento de Parasitología. La Habana, Cuba.

²Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Centro de Investigaciones Diagnóstico y Referencia, Departamento de Epidemiología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: mendiola@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris* son amebas de vida libre que producen daños sustanciales del sistema nervioso central y cuyo diagnóstico *premortem* es poco frecuente.

Objetivo: Proveer una visión general de los aspectos clínico-epidemiológicos y las posibilidades diagnósticas más eficaces en la meningoencefalitis amebiana primaria y la encefalitis granulomatosa amebiana, así como las experiencias de tratamiento expuestas en la literatura reciente.

Métodos: Se realizó una revisión bibliográfica sobre las amebas de vida libre. Se analizó la información obtenida de artículos científicos en la base de datos *Google Scholar*®, *PubMed* y las citas relacionadas por el programa en *PubMed Central*.

Análisis y síntesis de la información: En primer término del análisis de la meningoencefalitis amebiana primaria y la encefalitis granulomatosa amebiana, resalta la diferenciación de sus características clínicas y epidemiológicas, también que el líquido cefalorraquídeo presenta gran relevancia para el diagnóstico de la meningoencefalitis

amebiana primaria. Sin embargo, para los casos presuntivos de la encefalitis granulomatosa amebiana el examen del líquido cefalorraquídeo depende de la valoración riesgo-beneficio y se ha obtenido mayor positividad con el diagnóstico histopatológico de biopsias *premortem*. En general, se acrecienta la implementación de la investigación del ADN por diferentes métodos que brindan certeza de cada una de las especies de AVL causantes de enfermedad neurológica. El aislamiento en cultivo confirmatorio de *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* presenta diferencias en la factibilidad de crecimiento en diversos medios de acuerdo con la especie y limitaciones adicionales.

Conclusiones: La mortalidad asociada con las infecciones del sistema nervioso central por amebas de vida libre permanece alta, aunque varios estudios brindan experiencias útiles a partir de los casos de pacientes que han sobrevivido. Resulta importante tener en cuenta que el diagnóstico rápido de la infección es clave para un tratamiento exitoso.

Palabras clave: *Naegleria fowleri*; *Acanthamoeba*; *Balamuthia mandrillaris*; meningoencefalitis amebiana primaria; encefalitis granulomatosa amebiana.

ABSTRACT

Introduction: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. and *Balamuthia mandrillaris* are free-living amoebae of infrequent premortem diagnosis which cause substantial damage to the central nervous system.

Objective: To provide an overview of the clinical-epidemiological aspects and the most effective diagnostic possibilities in primary amebic meningoencephalitis and granulomatous amebic encephalitis, as well as their treatment experiences in recent publications..

Methods: A bibliographic review was conducted about free-living amoebae. An analysis was performed of data obtained from scientific papers published in the databases Google Scholar and PubMed, and the citations listed by the PubMed Central program.

Data analysis and synthesis: As principal term of the analysis of primary amebic meningoencephalitis and amebic granulomatous encephalitis, the differentiation of their clinical and epidemiological characteristics stands out, also that cerebrospinal fluid is highly relevant for the diagnosis of primary amebic meningoencephalitis. However, for presumptive cases of amoebic granulomatous encephalitis, the examination of cerebrospinal fluid depends on the risk-benefit assessment and greater positivity has been obtained with the histopathological diagnosis of premortem biopsies. In general, the implementation of DNA research by different methods provided accurate information about each one of the

free-living amoeba species that cause neurological disease. Confirmatory culture isolation of *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. and *B. mandrillaris* revealed growth feasibility differences between diverse media depending on the species and additional limitations.

Conclusions: Mortality associated to central nervous system infections caused by free-living amoebae remains high. Studies describing cases of patients who have survived constitute useful material. It is important to bear in mind that fast diagnosis of the disease is crucial to treatment success.

Keywords: *Naegleria fowleri*; *Acanthamoeba*; *Balamuthia mandrillaris*; primary amebic meningoencephalitis; granulomatous amebic encephalitis

Recibido: 08/08/2019

Aceptado: 13/07/2020

Introducción

Naegleria fowleri, diversas especies del género *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia diploidea (pedata)* son amebas de vida libre (AVL) que son patógenas para humanos y animales. Estas especies de AVL habitan aguas naturales como lagos, arroyos, aguas termales, cascadas, así como aguas de acueducto residencial, piscinas y diversos lugares para baños recreativos, incluso para hidroterapia y aguas de drenaje,^(1,2,3,4) además se aislaron de tierra y partículas de polvo atmosférico,^(2,5) humidificadores y equipamiento hospitalario.⁽⁶⁾ Las infecciones por AVL producen daños en el sistema nervioso central (SNC), pueden localizarse en otros órganos, así como *Acanthamoeba* spp. puede producir infecciones corneales graves asociadas generalmente al uso incorrecto de lentes de contacto.⁽²⁾ Las AVL pueden también actuar como hospederos o vehículos de microorganismos filogenéticamente diversos llamados endocitobiontes, algunos con importancia para la salud pública (*Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium complex*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7),⁽⁷⁾ donde las amebas facilitan la dispersión a varios hábitats, la resistencia a sustancias antisépticas y mayor virulencia.⁽⁸⁾ Estos protozoos y las enfermedades asociadas han acaparado la atención de científicos y del personal de salud en la actualidad, con el fin

de mejorar el pronóstico desfavorable de los pacientes diagnosticados, así como trazar medidas preventivas eficaces.⁽⁹⁾

Se considera que los casos de infecciones del SNC por AVL no se encuentran reportados adecuadamente a escala global. Por una insuficiente difusión del conocimiento tanto de aspectos clínicos, como de factores de riesgo, es menos probable avizorar su presencia, a lo cual se suman las dificultades en la implementación de herramientas diagnósticas.⁽¹⁰⁾ No se precisa el número de reportes mundiales de infecciones con *N. fowleri* asociadas a la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), pero la compilación de casos publicados muestra alrededor de 300 hasta 2016.⁽¹¹⁾ Escasos estudios epidemiológicos han prestado atención a la distribución geográfica de la MAP, pero se han reportado casos en casi todos los continentes.^(4,12) La mayoría de los casos reportados en la literatura científica provienen de Norteamérica.⁽¹³⁾ En Cuba, se reconoce internacionalmente la descripción de un caso de infección por *N. fowleri* hasta el presente.⁽¹⁴⁾ Un estudio previo realizado en Cuba en 1978 por *García Tijera* y otros⁽¹⁵⁾ no abarcó plenamente el perfil de cuadro clínico de MAP a la luz de la experiencia actual, posteriormente *Sierra*⁽¹⁶⁾ presentó escasas evidencias de manifestaciones clínicas, de positividad al cultivo y a la prueba de flagelación como identificación de *N. fowleri* en los líquidos cefalorraquídeos (LCR) de dos pacientes cubanos con meningoencefalitis. En general, no se estudiaron las probables fuentes de infección para esos casos, lo cual es necesario para abrir las puertas a la investigación del riesgo epidemiológico de estas infecciones en Cuba.

Las infecciones del SNC que muestran encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) cuentan con más de 150 reportes de pacientes con encefalitis por *Acanthamoeba* spp y con *B. mandrillaris* alcanzan aproximadamente 200 casos.⁽¹¹⁾ En solo un paciente con encefalitis se aisló *S. diploidea (pedata)*.⁽¹⁷⁾ *Pietrucha-Dilanchian* y otros⁽¹⁸⁾ describieron un caso único de encefalitis en el que se presentó infección con *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris* y *Toxoplasma gondii*.

Se producen daños endoteliales durante la invasión de tejidos por AVL, estas cruzan la barrera hematoencefálica, causan inflamación granulomatosa y estimulan eventos tromboembólicos, con aumento de la permeabilidad vascular, liberación de citoquinas y en última instancia necrosis tisular.^(10,11) De modo que existe un amplio espectro de diagnósticos diferenciales para las infecciones con AVL como por ejemplo: meningitis virales y bacterianas, tumores cerebrales, esclerosis múltiple, encefalitis por lupus, leucoencefalopatía multifocal progresiva, choque, toxoplasmosis cerebral, enfermedades vasculares oclusivas y aneurismas,⁽¹⁰⁾ por lo que se requiere sospechar con agudeza la

etiología amebiana por los profesionales médicos y de laboratorio para detectar y tratar tempranamente las infecciones por AVL, frente a la carencia de una terapia antimicrobiana óptima y un alto índice de fatalidad.

Este trabajo de revisión se realizó con el objetivo de proveer una visión general de los aspectos clínico-epidemiológicos y las posibilidades diagnósticas más eficaces en la meningoencefalitis amebiana primaria y la encefalitis granulomatosa amebiana, así como las experiencias de tratamiento.

Métodos

Se realizó una búsqueda de información en artículos científicos en la base de datos de *Google Scholar*®, *PubMed* y las citas relacionadas por el programa en *PubMed Central*, en una estrategia de complementar progresivamente la información, sin especificar el periodo de tiempo. Este análisis puede contribuir a promover el diagnóstico de las infecciones causadas por las principales AVL: *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*.

Resultados

Meningoencefalitis amebiana primaria causada por *N. Fowleri*

Cuadro clínico y hallazgos patológicos

Los síntomas típicos de MAP aparecen durante la primera semana después de la exposición a *N. fowleri*. No existen características clínicas distintivas para diferenciar MAP de otros tipos de meningitis.⁽¹⁰⁾ Por ello, es muy importante que el personal médico obtenga de los pacientes los antecedentes de haber estado en contacto con alguna fuente de agua que penetró por las fosas nasales mediante actividades diversas en las que predominan las recreativas,⁽¹⁹⁾ aunque también se han producido infecciones por prácticas religiosas y culturales, las cuales incluyen la irrigación de los senos nasales con agua de la red contaminada.⁽³⁾ Los síntomas iniciales son cefalea severa, fiebre alta, náuseas, vómitos y fatiga, pero la enfermedad avanza rápidamente hacia anormalidades neurológicas tales como rigidez de nuca, letargo, confusión, irritabilidad, anorexia, convulsiones, coma, diplopia, anormalidades de los nervios craneales asociadas a aumento significativo de la presión intracraneal y la presencia de hernia.^(4,20,21) El estudio retrospectivo de 142 casos de MAP en Estados Unidos determinó un curso clínico fulminante, con una progresión rápida desde los primeros síntomas que ocurrió con una mediana de solo 5 días.⁽¹³⁾ En esta

investigación, el 79 % de las imágenes de tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM) se informaron como anormales y no específicas y se interpretaron como edema cerebral difuso con signos de aumento de la presión intracraneal (desplazamiento de la línea media y borrado de surcos corticales y de espacios basilares, particularmente cisternas), realce leptomeníngeo con contraste, disminución del tamaño de los ventrículos, áreas de hemorragia, necrosis y/o hernia.⁽¹³⁾ En los análisis *post mortem* de los pacientes con MAP se reveló la inflamación del encéfalo con daño tisular severo a través del área de invasión, con ulceración de la mucosa olfatoria y necrosis de los nervios olfatorios. Microscópicamente, los bulbos olfatorios se presentaron totalmente desorganizados por exudados purulentos y por vasos necróticos y hemorrágicos y en la corteza frontal adyacente se detectó un número considerable de trofozoitos invasores.⁽¹²⁾ El hallazgo *post mortem* de trofozoitos en órganos como bazo, pulmones, corazón, y riñones de casos de MAP, algunos donados para ser trasplantados, ha abierto la interrogante sobre la diseminación de los organismos de esta especie más allá del SNC (evento que se describe en las infecciones con *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*) y acerca de los posibles riesgos para los receptores.^(22,23)

Diagnóstico de laboratorio/microbiológico

N. fowleri presenta tres estados en su ciclo de vida: trofozoito, quiste y flagelado. La identificación de las características biológicas es de gran importancia para el diagnóstico^(4,12,24).

Tal como se muestra en la tabla, el LCR es una muestra imprescindible para la pronta identificación de la presencia de *N. fowlei*. El aspecto macroscópico del LCR es turbio y ligeramente hemorrágico. Además se presenta un aumento del número de células, principalmente neutrófilos, la concentración de glucosa es baja y las proteínas totales se elevan.⁽¹¹⁾ Las experiencias publicadas en diversos estudios indican la necesidad urgente del empleo del diagnóstico presuntivo mediante el examen directo del LCR en busca de los trofozoitos tanto en fresco, como por la aplicación de tinciones como Wright y Giemsa. Es importante destacar que al analizar 13 casos de sobrevivientes en edad pediátrica, en todos se realizó el diagnóstico rápidamente por la observación de trofozoitos móviles en el LCR.⁽²⁵⁾

Se ha recomendado que tan pronto como sea posible después de la obtención del LCR o con líquidos bien conservados a 25 °C, se deberá agitar levemente el tubo de la muestra para desprender amebas posiblemente adheridas, realizar una centrifugación breve de la muestra (500 g por 5 min) para concentrar las células, retirar el sobrenadante, dejando

aproximadamente entre 200 y 300 µL de líquido residual y un sedimento. Ambos se mezclan para tomar la muestra que se coloca sobre una lámina portaobjeto, se cubre y se incuba brevemente entre 35 y 37 °C para facilitar el movimiento de las amebas. Se recomienda observarlas mediante microscopía de contraste de fase. Esta muestra es útil para preparar frotis del concentrado celular, fijar y colorear con Giemsa para identificar presuntivamente los trofozoitos.^(26,27) Las imágenes de adecuada resolución que se obtengan pueden enviarse para compartir criterios, en espera de la confirmación.⁽²⁷⁾ Es un método simple, rápido y de menor costo. Sin embargo, existen dificultades para la identificación de *N. fowleri* si no se indica este examen directo, si no hay habilidades para la observación microscópica, si la conservación y transporte de la muestra no se realiza a 25 °C. En el estudio de mayor número de casos en EE UU,⁽¹³⁾ reportaron 53 LCR obtenidos *premortem*, aunque solamente 38 muestras resultaron positivas al examen directo. En Pakistán, se estudiaron retrospectivamente (periodo 2014-2015) los LCR de 15 pacientes cuya positividad fue comprobada por reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, del inglés, *polymerase chain reaction*) y solamente 7 se registraron positivos por microscopía.⁽²¹⁾

Tabla - Métodos diagnósticos de laboratorio para MAP, EGA y lesiones cutáneas, pulmonares y de senos nasales causadas por infecciones con AVL

AVL	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba spp.</i>	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Sappinia pedata</i>
Muestras útiles para diagnóstico	- LCR - Tejidos <i>post mortem</i>	- LCR - Biopsia de tejido encefálico poscirugía o <i>post mortem</i> - Biopsias de piel, senos nasales, tejido pulmonar y muestra de lavados broncoalveolares.	- Biopsia de tejido encefálico poscirugía o <i>post mortem</i> - Biopsias de piel, senos nasales, tejido pulmonar y de otros órganos. - LCR	- Biopsia de tejido encefálico poscirugía
Métodos recomendados para diagnóstico	- Examen directo del LCR en busca de los trofozoitos, en fresco y en frotis coloreados con Wright o Giemsa. - Cultivo xénico, con líneas celulares de mamíferos y axénico. - Prueba de flagelación. - PCR del LCR y tejidos. - Análisis histopatológico morfológico y acoplado a inmunofluorescencia e inmunohistoquímica con anticuerpos específicos.	- Análisis histopatológico morfológico y acoplado a tinción por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de trofozoitos y quistes. - PCR (de LCR, biopsias y cortes de tejidos archivados) - Examen directo del LCR en busca de los trofozoitos, en fresco y por tinciones. - Cultivo xénico, con líneas celulares de mamíferos y axénico	- Análisis histopatológico morfológico y acoplado a identificación de trofozoitos y quistes por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica - PCR (de LCR, biopsias y cortes de tejidos archivados) - Cultivo con líneas celulares de mamíferos	- PCR de biopsias. - Cultivo xénico - Cultivo con líneas celulares de mamíferos
Métodos de menor eficacia para diagnóstico		- Examen directo del LCR en busca de los trofozoitos, en fresco y por tinciones - Cultivo del LCR	- Examen del LCR ya sea por microscopía o PCR - Cultivo xénico de cualquier muestra	-No se pueden evaluar sobre la base de un solo caso

Otros autores también sugieren la detección de casos de MAP mediante cultivos del LCR o de muestras *post mortem* de tejido, los cuales pueden proveer evidencias confirmatorias.^(26,28) El cultivo puede realizarse en condiciones xénicas (medios con bacterias inactivadas), axénicas (medios que no contienen ninguna otra célula metabolizando activamente que el propio parásito), así como en co-cultivos con líneas celulares de mamíferos.⁽²⁹⁾ Todas las muestras de trofozoitos de cultivo o de sedimento del LCR deben pasar la prueba de obtención de flagelados como requisito específico del género^(3,24) (tabla). Las técnicas de cultivo tienen como desventaja que los resultados positivos pueden demorar y dependen del número de amebas presentes en el inóculo y su estado de conservación, pueden tener interferencias por la contaminación de otros microorganismos que no puede ser eliminada con el uso de anfotericina B y azoles, solamente se recomiendan penicilina-estreptomicina o gentamicina y se requieren cultivos controles positivos en paralelo para chequear el reconocimiento del crecimiento de las amebas.⁽²⁹⁾ La axenización es generalmente un paso posterior al aislamiento.⁽³⁰⁾ Este protozoo ha sido considerado de gran riesgo y se recomienda su cultivo con extremo cuidado en condiciones que garanticen la bioseguridad en su manipulación.^(27,31) En la figura 1 podemos observar trofozoítos de *Naegleria fowleri* de la cepa HB-1,⁽³²⁾ donada al Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) por el Instituto de Postgrado para Médicos y Farmacéuticos, Praga, Checoslovaquia, a partir de una impronta del crecimiento en medio de agar NN (no nutriente) según *Cerva*⁽²⁶⁾ coloreada con la tinción tricrómica de Gomori. Se muestra la lobopodia característica (L) que hace que adopten la forma *limax* o de molusco, el citoplasma vacuolado (CV) y el núcleo (N) con un nucleolo grande y central con un halo blanco a su alrededor.

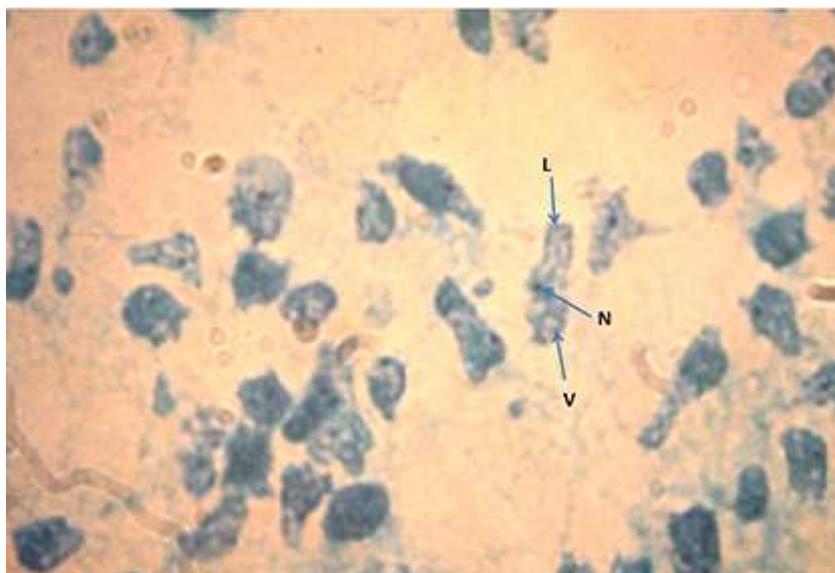


Lámina donada al Departamento de Parasitología del IPK por el Instituto de Postgrado para Médicos y Farmacéuticos, Praga, Checoslovaquia.

N: núcleo, V: vacuolas y L: lobopodia.

Fig. 1 - Trofozoítos de *Naegleria fowleri* de la cepa HB-1.⁽³²⁾ Se coloreó una impronta del crecimiento en medio de agar NN (no nutriente) según *Cerva*⁽²⁶⁾ con la tinción tricrómica de Gomori (400X).

Aunque el examen morfológico de las AVL ha resultado fundamental, algunos artículos refieren la observación de células con morfología atípica,^(33,34,35) en los cuales fue necesario aplicar análisis genéticos. Con una respuesta efectiva,^(20,33,34) se encuentra un ensayo PCR múltiple en tiempo real para el gen mitocondrial multicopia que codifica el ARN ribosomal 18S (18S *rRNA*, del inglés *ribosomal ribonucleic acid*) el cual ofrece un procedimiento prometedor para obtener un diagnóstico confirmatorio rápido y específico para MAP, EGA, la queratitis por *Acanthamoeba* spp. y la encefalitis por *S. pedata*,^(36,37) en un marco apropiado para el tratamiento, pero solamente unos pocos laboratorios de referencia tienen esta capacidad implementada y la utilizan como *gold estándar*.^(4,10,11) A las técnicas de amplificación de ADN se ha adicionado la confirmación mediante secuenciación del fragmento resultante,^(33,20,38) la genotipificación^(1,39) y recientemente, se detectó un caso de *N. fowleri* mediante secuenciación de nueva generación que luego se confirmó por el PCR que utilizó como diana la región del espaciador de transcritores internos (*ITS*, del inglés *internal transcriber spacer*) concerniente al gen del ARN ribosomal 5.8S (5.8S *rRNA*, del inglés *ribosomal ribonucleic acid*).⁽⁴⁰⁾ Ambos PCR presentaron similar sensibilidad y especificidad para detectar *N. fowleri*.⁽⁴¹⁾

Estas tecnologías basadas en el análisis genético se deben implementar con la mayor premura ya que la mayoría de las infecciones con *N. fowleri* (fundamentalmente las recopiladas en EE UU) se confirmaron a través del análisis histológico *post mortem*,^(10,13)

en el cual predominó el análisis morfológico, aunque también se utilizó la ratificación a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta e inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales o monoclonales para identificar los trofozoitos en cortes de tejido encefálico, la técnica de PCR, o recurrieron a estos tres criterios.⁽¹⁾ En la figura 2 se muestra una imagen de los trofozoitos de *N. fowleri* a partir de una muestra de tejido del encéfalo de un caso fatal de un niño de 11 años de Bohemia norte que se bañó en las aguas de enfriamiento de una planta eléctrica de esta localidad en la cual los trofozoitos redondeados se distinguen en un vaso sanguíneo por el núcleo con un nucleolo grande y central con un halo blanco a su alrededor. En los tejidos no se han encontrado quistes de *N. fowleri*. De modo similar se identificaron trofozoitos *post mortem* en el caso de Cuba.⁽¹⁴⁾

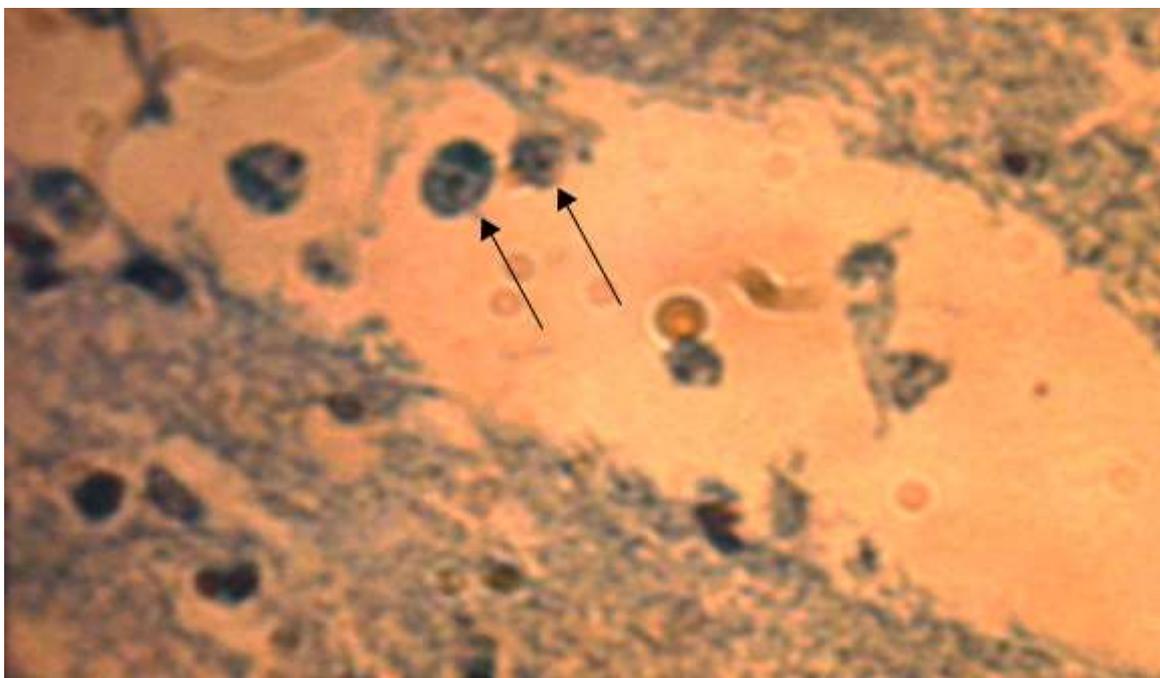


Lámina donada al Departamento de Parasitología del IPK por Instituto de Postgrado para Médicos y Farmacéuticos, Praga, Checoslovaquia (400X).

Fig. 2 - Trofozoitos de *Naegleria fowleri* teñidos con hematoxilina-tricrómica de Gomori en un corte histológico del encéfalo de un caso fatal de un niño de 11 años de Bohemia norte que se bañó en las aguas de enfriamiento de una planta eléctrica de esta localidad.

Aspectos generales sobre el tratamiento

Aún se desconocen los esquemas óptimos de tratamiento de MAP, la característica común de estos es el uso de anfotericina B intravenosa, la cual se utilizó para los 13 casos pediátricos que sobrevivieron a la infección.⁽²⁵⁾ Sin embargo, se recomienda la adición de anfotericina B intratecal y otros agentes antimicrobianos tales como fluconazol, azitromicina, rifampicina y miltefosina, en dosis fundamentalmente descritas solo por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de E. U. (CDC, del inglés *Center for*

Disease Control and Prevention)⁽⁴²⁾ en un régimen de tratamiento que se ha perfilado recientemente y que incluyó dosis máximas de cada antibiótico.⁽⁴³⁾ Como coadyuvantes se recomendaron: el manejo riguroso de la presión intracraneal, dexametasona y la hipotermia terapéutica. Por ejemplo, un caso superviviente de una adolescente de 12 años fue tratado con anfotericina B convencional intravenosa a 1,5 mg/kg dividida en dos dosis por día, con fluconazol 10mg/kg/día, rifampicina 10mg/kg/día y azitromicina 10mg/kg/día. Concurrentemente se inició dexametasona. Luego de tres días, la anfotericina B iv se redujo a 1 mg/kg/día. A las 36 h de la admisión se le administró miltefosine oral, 50 mg cada 8 h. Ante el aumento de la presión intracraneal, se precisó manejo de este signo y se intercaló a las 24 h de admisión, anfotericina B intratecal 1,5 mg por dos días, seguido de una dosis de 1 mg cada dos días por 8 días. Mantuvo los antibióticos miltefosine, azitromicina, rifampicina y fluconazol durante 26 días.⁽⁴⁴⁾ Con un tratamiento similar, sin administración intratecal, se recuperó un niño de 6 años en la India.⁽⁴⁵⁾ No obstante seguir estas recomendaciones, la letalidad es alta y plantea interrogantes sobre los determinantes para la supervivencia, ya sea por factores patogénicos de diferentes cepas de *N. fowleri* o factores de la susceptibilidad del hospedero que al esclarecerse pudieran modificar las estrategias actuales de tratamiento.⁽²⁵⁾

Encefalitis granulomatosa producida por *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*.

Cuadro clínico y hallazgos patológicos

La EGA puede ser causada por *B. mandrillaris* y varias especies de *Acanthamoeba* con mayor frecuencia en individuos inmunocomprometidos, generalmente por trasplantes de órganos o médula ósea, VIH/SIDA, enfermedades linfoproliferativas o hematológicas, diabetes mellitus, pneumonitis, fallo renal, enfermedades hepáticas y gammaglobulinemia, aunque también se presentó en individuos inmunocompetentes.⁽⁴⁶⁾ Después de la exposición primaria a través de la piel o las vías respiratorias, estas amebas invaden el torrente circulatorio y se diseminan por la sangre hacia el encéfalo. Estas pueden también dañar otros órganos como por ejemplo: los pulmones, la piel o la mucosa nasal y senos paranasales (muy raramente). Las lesiones ulcerativas o nodulares en la piel pueden estar ausentes, anteceder semanas a meses las manifestaciones neurológicas o son simultáneas.^(4,23,47) Sin embargo, el periodo de incubación no está definido, al difícilmente poder asociarse el momento de la exposición al agente. La enfermedad comienza lentamente y los síntomas se

desarrollan entre semanas y meses. En la balamuthiasis el curso puede ser más corto, entre 1 y 30 días. Los signos típicos de EGA son fiebre, cefalea, fatiga, debilidad y náusea, que progresan a signos neurológicos como estado mental alterado, hemiparesis, convulsiones, visión borrosa y diplopia, a los cuales se le pueden adicionar posteriormente alteraciones de los nervios craneales, vértigo, ataxia, confusión y cambios de personalidad.^(4,7,35) Las lesiones encefálicas pueden ser detectadas por neuroimágenes obtenidas mediante TC y RM, pero los resultados no son específicos. Típicamente muestran lesiones múltiples, focales, bien definidas, ocupando espacio como anillo contrastante, con edema perilesional y resaltando las leptomeninges si las meninges están comprometidas.^(18,48,49) Los análisis *post mortem* del encéfalo revelan edema cerebral, áreas de ablandamiento cortical y de los ganglios basales, así como múltiples áreas necróticas y hemorrágicas. Se encuentran tanto trofozoitos como quistes en todos los tejidos afectados.⁽¹¹⁾

Diagnóstico de laboratorio/microbiológico

La detección microscópica de las características morfológicas (de los estados de trofozoito y quiste de *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*)^(4,50) ha sido el método convencional comúnmente utilizado para el diagnóstico de los agentes causantes de EGA. Con este fin se han utilizado muestras como el LCR, las biopsias de tejido encefálico (que pueden ser posteriores a la resección quirúrgica o *post mortem*), las biopsias de piel, senos nasales, de tejido pulmonar y muestras de lavados broncoalveolares,⁽⁷⁾ como se describe en la tabla.

El examen del LCR en los casos de EGA revela pleocitosis linfocítica no específica con niveles elevados de proteínas y concentraciones normales o inferiores de glucosa, a diferencia de los casos de MAP, donde se observan abundantes neutrófilos en similitud con la meningitis bacteriana. Además, en comparación con la MAP, en la observación microscópica de la preparación fresca de LCR se detectaron muy dispersos trofozoitos⁽³⁵⁾ o estuvieron ausentes^(4,38,48) para los casos de EGA debidos a *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*. Con ambos agentes, no se han observado quistes en el LCR. Incluso en una serie de casos confirmados de *B. mandrillaris* a través de técnicas histopatológicas y/o moleculares en el CDC, la positividad alcanzó un 88 % con la biopsia encefálica como muestra y solamente un 6% mostró positividad en el LCR.⁽⁵¹⁾ Algunos autores plantean que la detección de ADN de *B. mandrillaris* e incluso *Acanthamoeba* en el LCR pudiera deberse a una lisis de las amebas en el tejido encefálico afectado, pero se reportaron casos de supervivientes con LCR positivos por PCR y cultivo, que hablan a favor de preservar este tipo de muestra para su análisis.⁽²³⁾

El empleo de técnicas de cultivo en los casos de sospecha de EGA debe dirigirse a evitar las diferencias de adaptación a los medios entre los organismos de ambos géneros, por lo que simultáneamente se deben colocar muestras de biopsia en cultivo xénico y en cultivo de tejidos de mamíferos.⁽³⁾ Definitivamente, el cultivo con líneas celulares de diferentes fuentes como riñón (MKC), fibroblastos de riñón (Cos-7, Vero), células ováricas (CHO) y células pulmonares embrionarias (MRC5), entre otras, ha sido propicio para todas las especies causantes de EGA.^(5,23) La muestra de la biopsia, al colocarla sobre agar no nutriente conteniendo bacterias inactivas e incubarse por más de 48 h a 37 °C, dará resultados positivos si contiene *Acanthamoeba* spp. Mientras que si la muestra contiene *B. mandrillaris*, su crecimiento en cultivo con líneas celulares puede revelarse como efecto citopático hasta 14 días posteriores a la incubación, ya que su crecimiento es lento.⁽⁵⁾ Aunque es un método altamente específico, tiene baja sensibilidad, puede ser ineficiente, laborioso y requiere experiencia técnica para su interpretación.⁽⁵²⁾

Actualmente, el PCR es el método de elección para la detección con mayor sensibilidad y rapidez de *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* y en paralelo, se aplica el diagnóstico microscópico en cortes histológicos en busca de la morfología típica, que debe acoplarse a las técnicas de inmunofluorescencia y/o inmunohistoquímica para la diferenciación del género causante de EGA. Coloraciones como la del ácido peryódico de Schiff, la de metenamina-plata de Gomori o la de blanco Calcoflúor facilitan la distinción de formas quísticas en los tejidos.^(4,53) La sensibilidad del análisis histopatológico morfológico puede ser insatisfactoria por problemas en el procedimiento de escisión de la lesión.

Las técnicas de amplificación de ADN más utilizadas^(2,3) tienen como base el gen mitocondrial multicopia que codifica el ARN ribosomal 18S, la mayoría según *Qvarnstrom*.⁽³⁶⁾ Se han diagnosticado múltiples casos por PCR con ADN de biopsias de encéfalo, piel y con muestras fijadas con formalina y en bloques de parafina que han permitido la detección retrospectiva.^(23,48,49) También en varios casos se comprobó la identidad del fragmento amplificado mediante secuenciación.^(35,38)

Es importante también diagnosticar *Acanthamoeba* spp en infecciones de la piel, muestras de pulmón, de senos nasales y de lavados broncoalveolares. Cuando se identificó *B. mandrillaris pre-mortem* en ulceraciones de la piel, se presentó una oportunidad para prever la infección subsiguiente en el SNC. Aproximadamente 50 % de los supervivientes a esta infección tuvieron como antecedente una lesión de piel que alertó.^(4,7,54) Las infecciones pueden diseminarse al pulmón, riñones, e incluso a huesos causando osteomielitis, aunque

con mayor frecuencia se observaron trofozoitos y quistes de *B. mandrillaris* en muestras de tejido pulmonar⁽¹¹⁾ o el PCR reveló la presencia de *Acanthamoeba* spp en este órgano.⁽³⁵⁾ En la última columna de la tabla se refleja la única experiencia derivada de la descripción de un caso de EGA causado por *Sappinia diploidea (pedata)*. Las amebas del género *Sappinia* pueden distinguirse de otras AVL por la presencia de un núcleo doble, en el cual los dos cariomas se disponen muy próximos con una separación lineal o en banda, lo cual se presentó claramente en secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina, Giemsa o con ácido peryódico (Schiff).⁽¹⁷⁾ Además diversos aislamientos ambientales posteriores han sido cultivados en medio xénico o con líneas celulares de mamíferos.⁽⁵⁵⁾

Aspectos generales sobre el tratamiento

La infección del SNC por *B. mandrillaris* no cuenta tampoco con un régimen de tratamiento altamente exitoso. El CDC recomienda los siguientes fármacos: pentamidina isetionato, miltefosina, fluconazol, flucitosina, sulfadiazina, azitromicina y/o claritromicina,⁽⁵⁶⁾ pero no se conoce el fármaco, las dosis y la duración del tratamiento más apropiados, dadas las limitaciones para realizar ensayos clínicos aleatorios.⁽⁵⁷⁾ Vollmer y Glaser⁽⁵⁷⁾ presentaron el análisis retrospectivo de 10 casos sobrevivientes en el periodo 2003-2016. La mayoría de los sobrevivientes recibieron pentamidina entre 1 y 4 mg/kg/día con 300 mg al día como máximo, aunque este fármaco tiene una penetración limitada de la barrera hematoencefálica y una toxicidad clínica significativa. El fármaco miltefosina se incorporó a la terapia contra AVL desde 2006 y parece prometedor ya que su presencia en el esquema múltiple a 150 mg cada 24 horas durante 12 días, luego 100 mg diarios aportó una ventaja para sobrevivir, aunque no fue el único esquema con resultados positivos.⁽⁵⁷⁾ El tratamiento descrito⁽⁵⁷⁾ para el caso superviviente de balamuthiasis es ejemplo del uso intensivo y prolongado de antibióticos. A partir de la tercera semana del ingreso se administró pentamidina (de forma continua por 5 semanas que al paso de estas se retiró por toxicidad), sulfadiazina (5 semanas), fluconazol (100 semanas), flucitosina (4 semanas), claritromicina (dos semanas alternas debido a la toxicidad) y miltefosina (desde la quinta semana se mantuvo 11 semanas). De este modo, después de 8 semanas de ingreso, el paciente se mantuvo tratado por un largo periodo de tiempo con fluconazol, miltefosina, azitromicina y trimetoprim-sulfa. En los casos revisados se observó que los fármacos seleccionados dependen del manejo clínico ante la evolución del paciente y están basados en la experiencia previa con casos reportados de supervivientes, los resultados de ensayos *in vitro* con estos fármacos y sus combinaciones, así como ensayos con modelos animales.⁽⁴²⁾ Los estudios realizados *in vitro* indicaron muy poca actividad inhibidora del crecimiento amebiano para fluconazol,

sulfadiazina y flucitosina, mientras azitromicina, pentamidina, miltefosina y voriconazol mostraron actividad amebicida o amebostática.⁽⁵⁸⁾ Por ello los resultados de los tratamientos actuales que emplean diferentes combinaciones experimentales de estos fármacos son inconsistentes, dando sobrevivencia en unos casos y fatalidad en otros. La terapia se puede perfeccionar con la resección quirúrgica completa de lesiones únicas, lo cual se convierte en un alerta para el reconocimiento temprano de esta enfermedad que permitiría que una mayor proporción de casos mejoraran su pronóstico.^(7,58)

La EGA por *Acanthamoeba* spp. carece de un régimen terapéutico estándar, utiliza también combinaciones de 4 y 5 antibióticos, donde los más efectivos son miltefosina, azoles, pentamidina y cotrimoxazol y si es posible se acompaña de la escisión quirúrgica. Otras alternativas son: anfotericina B liposomal, voriconazol y miltefosina.^(7,59,60) Las brechas del conocimiento actual promueven las investigaciones en nuevos acercamientos terapéuticos,⁽³⁰⁾ con nuevos métodos de administración de fármacos al SNC, hacia un mayor dominio de los mecanismos fisiopatológicos, así como esclarecer el papel de la respuesta inmune, en conjunción con los factores genéticos y ambientales que contribuyen a la mortalidad por infecciones con AVL.

Conclusiones

La mortalidad asociada con las infecciones del SNC por AVL permanece alta, aunque varios estudios compilan las experiencias útiles con los supervivientes. Lo más importante, es que el diagnóstico rápido de la infección, es necesario para un tratamiento exitoso. Del análisis de la MAP y la EGA se destaca en primer lugar la identificación de las características clínicas y epidemiológicas, a lo cual sigue que el LCR presenta gran relevancia para el diagnóstico de la MAP, mientras depende de la valoración riesgo-beneficio para los casos presuntivos de EGA. En esta última, se ha obtenido mayor éxito con el diagnóstico histopatológico de biopsias y en general se acrecienta la implementación de la investigación del ADN por diferentes métodos que brindan certeza de cada una de las especies de AVL causantes de enfermedad neurológica. El aislamiento en cultivo confirmatorio de *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* presenta diferencias de la factibilidad de crecimiento en diferentes medios de acuerdo con la especie y limitaciones adicionales, pero resulta útil para abordar diversos aspectos sobre la MAP y la EGA en relación con el conocimiento científico que está en progreso en la actualidad acerca de estos protozoos y de los factores de predisposición subyacentes en el hospedero.

Agradecimientos

A los conocimientos esenciales brindados por el Dr. Lubor Cervá, del Instituto de Postgrado para Médicos y Farmacéuticos, Praga, Checoslovaquia, que al pasar del tiempo aún conservan su vigencia. A la colaboración del fotógrafo Alberto C. Álvarez que permitió guardar testimonio gráfico del entrenamiento, útil también para la docencia actual.

Referencias bibliográficas

1. Cope JR, Ratard RC, Hill VR, Sokol T, Causey JJ, Yoder JS, et al. The First Association of a Primary Amebic Meningoencephalitis Death with Culturable *Naegleria fowleri* in Tap Water from a U.S. Treated Public Drinking Water System. *Clin Infect Dis*. 2015;6:e36-e42. doi: 10.1093/cid/civ017
2. Bunsuwansakul C, Mahboob T, Hounkong K, Laohaprapanon S, Chitapornpan S, Jawjit S, et al. *Acanthamoeba* in Southeast Asia – Overview and Challenges. *Korean J Parasitol*. 2019;57:341-57. doi:10.3347/kjp.2019.57.4.341
3. Gabriel S, Khan NA, Siddiqui R. Occurrence of free-living amoebae (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*) in water samples in Peninsular Malaysia. *J Water Health*. 2019;17:160-71. doi: 10.2166/wh.2018.164
4. Gompf SG, Garcia C. Lethal encounters: The evolving spectrum of amoebic meningoencephalitis. *IDCases*. 2019;15:e00524. doi:10.1016/j.idcr.2019.e00524
5. Yera H, Dupouy-Camet J, Jackson JW, Sriram R, Sweat S, Goldstein JM, et al. *In vitro* growth, cytopathic effects and clearance of monolayers by clinical isolates of *Balamuthia mandrillaris* in human skin cell cultures. *Exp Parasitol*. 2015;156:61-7. doi:10.1016/j.exppara.2015.05.004
6. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:273-307. doi:10.1128/cmr.16.2.273-307.2003
7. Parija SC, Dinooop K, Venugopal H. Management of granulomatous amoebic encephalitis: Laboratory diagnosis and treatment. *Trop Parasitol*. 2015;5:23-8. doi:10.4103/2229-5070.149889
8. Balczun C, Scheid PL. Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses*. 2017;9:E65. doi:10.3390/v9040065

9. Doan N, Rozansky G, Nguyen HS, Gelsomino M, Shabani S, Mueller W, et al. Granulomatous amebic encephalitis following hematopoietic stem cell transplantation. *Surg Neurol Int.* 2015;6:S459-62. doi: 10.4103/2152-7806.166788
10. Ong TYY, Khan NA, Siddiqui R. Brain-eating amoebae: predilection sites in the brain and disease outcome. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1989-97. doi:10.1128/JCM.02300-16
11. Krol-Turminska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24:254-60. doi:10.5604/12321966.1233568
12. Martínez-Castillo M, Cárdenas-Zúñiga R, Coronado-Velázquez D, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol.* 2016;65:885-96. doi: 10.1099/jmm.0.000303
13. Capewell LG, Harris AM, Yoder JS, Cope JR, Eddy BA, Roy SL, et al. Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2015;4:e68-75. doi: 10.1093/jpids/piu103
14. Cubero-Menéndez O, Cubero-Rego D. Meningoencefalitis amebiana primaria: comunicación de un caso. *Rev Neurol.* 2004 [acceso: 09/06/2019];38:336-8. Disponible en: <https://www.neurologia.com/articulo/2003380>
15. García Tijera J, Sotolongo F, Cepero F, Ibarra E, García J. Meningoencefalitis amebiana primaria. Estudio de un caso sospechoso y revisión de la literatura médica. *Rev Cubana Med Trop.* 1978 [acceso: 09/06/2019];30:161-6. Disponible en: <http://files.sld.cu/digitalizacion-bmn/files/2018/05/0045-9178.1989.0074.0007.pdf>
16. Sierra Calzado, L. Demostración del ameboflagelado *Naegleria fowleri* como agente etiológico de meningoencefalitis amébrica primaria en Santiago de Cuba. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2011 [acceso: 09/06/2019];30:418-31. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002011000300003.
17. Walochnik J, Wylezich C, Michel R. The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol.* 2010;126:4-13. doi: 10.1016/j.exppara.2009.11.017
18. Pietrucha-Dilanchian P, Chan JC, Castellano-Sanchez A, Hirzel A, Laowansiri P, Tuda C, et al. *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* amebic encephalitis with neurotoxoplasmosis coinfection in a patient with advanced HIV infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1128-31. doi:10.1128/JCM.06252-11
19. Mavridou A, Pappa O, Papatzitze O, Dioli C, Kefala AM, Drossos P, et al. Exotic tourist destinations and transmission of infections by swimming pools and hot springs- A literature review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15.pii: E2730. doi:10.3390/ijerph15122730

20. Stubhaug TT, Reiakvam OM, Stensvold CR, Hermansen NO, Holberg-Petersen M, Antal EA, et al. Fatal primary amoebic meningoencephalitis in a Norwegian tourist returning from Thailand. *JMM Case Rep.* 2016;3:e005042. doi: 10.1099/jmmcr.0.005042
21. Ghanchi NK, Khan E, Khan A, Muhammad W, Malik FR, Zafar A. *Naegleria fowleri* meningoencephalitis associated with public water supply, Pakistan, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:1835-7. doi: 10.3201/eid2210.151236
22. Roy SL, Metzger R, Chen JG, Laham FR, Martin M, Kipper SW, et al. Risk for transmission of *Naegleria fowleri* from solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2014;14:163-71. doi: 10.1111/ajt.12536
23. Farnon EC, Kokko KE, Budge PJ, Mbaeyi C, Lutterloh EC, Qvarnstrom Y, et al. Transmission of *Balamuthia mandrillaris* by organ transplantation. *Clin Infect Dis.* 2016;63:878-88. doi:10.1093/cid/ciw422
24. Panda A, Khalil S, Mirdha BR, Singh Y, Kaushik S. Prevalence of *Naegleria fowleri* in Environmental Samples from Northern Part of India. *PLoS ONE.* 2015;10:e0137736. doi:10.1371/journal.pone.0137736
25. Stowe RC, Pehlivan D, Friederich KE, Lopez MA, DiCarlo SM, Boerwinkle VL. Primary amebic meningoencephalitis in children: a report of two fatal cases and review of the literature. *Pediatr Neurol.* 2017;70:75-9. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2017.02.004
26. Cerva L. Laboratory diagnosis of primary amoebic meningo-encephalitis and methods for the detection of limax amoebae in the environment. *Folia Parasitologica (Praha).* 1980 [acceso: 09/06/2019];27:1-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
27. Cope JR, Ali IK. Primary amebic meningoencephalitis: What have we learned in the last five years? *Curr Infect Dis Rep.* 2016;18:31. doi:10.1007/s11908-016-0539-4
28. Shakoor S, Beg MA, Mahmood SF, Bandea R, Sriram R, Noman F, et al. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:258-61. doi: 10.3201/eid1702.100442
29. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:342-54. doi:10.1128/cmr.15.3.342-354.2002
30. Rice CA, Troth EV, Russell AC, Kyle DE. Discovery of Anti-Amoebic Inhibitors from Screening the MMV Pandemic Response Box on *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Acanthamoeba castellanii*. *Pathogens.* 2020;9:E476. doi:10.3390/pathogens9060476

31. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Categorization of biological agents (2016). ACDP; 2016 p. 35. [acceso: 09/06/2019]. Disponible en: <http://www.hse.gov.uk/pubns/infection.pdf>
32. Culbertson CG, Ensminger PW, Overton WM. Pathogenic *Naegleria* sp.-study of a strain isolated from human cerebrospinal fluid. J Protozool. 1968 [acceso: 09/06/2019];15:353-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
33. Nicolas M, de Jonckheere JF, Pernin P, Bataille H, Le Bris V, et al. Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies). Bull Soc Pathol Exot. 2010;103:14-8. doi: 10.1007/s13149-009-0028-1
34. Chomba M, Muchelenganga LA, Fwoloshi S, Ngulube J, Mutengo MM. A case report: primary amoebic meningoencephalitis in a young Zambian adult. BMC Infect Dis. 2017;17:532. doi:10.1186/s12879-017-2638-8
35. Matsui T, Maeda T, Kusakabe S, Arita H, Yagita K, Morii E, et al. A case report of granulomatous amoebic encephalitis by Group 1 *Acanthamoeba* genotype T18 diagnosed by the combination of morphological examination and genetic analysis. Diagn Pathol. 2018;13:27. doi: 10.1186/s13000-018-0706-z
36. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. J Clin Microbiol. 2006;44:3589-95. doi:10.1128/JCM.00875-06
37. Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. J Infect Dis. 2009;199:1139-42. doi: 10.1086/597473
38. Crothers JW, Hsu L, Marty FM. Fulminant *Acanthamoeba castellanii* Encephalitis in an Ibrutinib-Treated Patient. Open Forum Infect Dis. 2020; 7: ofaa025. doi:10.1093/ofid/ofaa025
39. Coupat-Goutaland B, Régoudis E, Besseyrias M, Mularoni A, Binet M, Herbelin P, et al. Population Structure in *Naegleria fowleri* as Revealed by Microsatellite Markers. PLoS ONE. 2016;11:e0152434. doi:10.1371/journal.pone.0152434
40. Wang Q, Li J, Ji J, Yang L, Chen L, Zhou R, et al. A case of *Naegleria fowleri* related primary amoebic meningoencephalitis in China diagnosed by next-generation sequencing. BMC Infect Dis. 2018;18:349. doi:10.1186/s12879-018-3261-z
41. Streby A, Mull BJ, Levy K, Hill VR. Comparison of real-time PCR methods for the detection of *Naegleria fowleri* in surface water and sediment. Parasitol Res. 2015;114:1739-1746. doi:10.1007/s00436-015-4359-5

42. Grace E, Asbill S, Virga K. 2015. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis and treatment options. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:6677-6681. doi:10.1128/AAC.01293-15
43. Heggie TW, Kupper T. Surviving *Naegleria fowleri* infections: A successful case report and novel therapeutic approach. *Travel Medicine Infectious Disease.* 2017;16:49-51. doi:10.1016/j.tmaid.2016.12.005
44. Linam WM, Ahmed M, Cope JR, Chu C, Visvesvara GS, da Silva AJ, et al. Successful Treatment of an Adolescent with *Naegleria fowleri* Primary Amebic Meningoencephalitis. *Pediatrics.* 2015;135:e744–e748. doi:10.1542/peds.2014-2292
45. Sharma A, Sharma A, Guleria S. Successful treatment of a case of primary amoebic meningoencephalitis: How important is history taking. *Indian J Crit Care Med.* 2015;19:126-7. doi: 10.4103/0972-5229.151024
46. Łanocha-Arendarczyk N, Kolasa-Wołoskiuk A, Wojciechowska-Koszko I, Kot K, Roszkowska P, Krasnodębska-Szponder B, et al. Changes in the immune system in experimental acanthamoebiasis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. *Parasit Vectors.* 2018;11:517. doi: 10.1186/s13071-018-3108-x
47. Chang OH, Liu F, Knopp E, Muehlenbachs A, Cope JR, Ali I, et al. Centrifacial Balamuthiasis: case report of a rare cutaneous amebic infection. *J Cutan Pathol.* 2016;43:892-7. doi: 10.1111/cup.12748
48. Lau HL, De Lima Corvino DF, Guerra FM Jr, Malik AM, Lichtenberger PN, Gultekin SH, et al. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with AIDS: a challenging diagnosis. *Acta Clin Belg.* 2019 Aug 27;1-5. doi:10.1080/17843286.2019.1660023
49. Wara-Asawapati S, Intapan PM, Chotmongkol V. *Acanthamoeba* Brain Abscess Confirmed by Molecular Identification. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97:307-8. doi:10.4269/ajtmh.16-0375
50. Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol.* 1993;40:504-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04943.x>
51. Cope JR, Landa J, Nethercut H, Collier SA, Glaser C, Moser M, et al. The Epidemiology and Clinical Features of *Balamuthia mandrillaris* Disease in the United States, 1974-2016. *Clin Infect Dis.* 2019;68:1815-1822. doi: 10.1093/cid/ciy813

52. Karsenti N, Lau R, Pursell A, Chong-Kit A, Cunanan M, Gasgas J, et al. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of clinical *Acanthamoeba*. BMC Res Notes. 2017;10:355. doi:10.1186/s13104-017-2666-x
53. Kalra SK, Sharma P, Shyam K, Tejan N, Ghoshal U. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. Exp Parasitol. 2020;208:107788. doi:10.1016/j.exppara.2019.107788
54. Cabello-Vílchez AM, Rodríguez-Zaragoza S, Piñero J, Valladares B, Lorenzo-Morales J. *Balamuthia mandrillaris* in South America: an emerging potential hidden pathogen in Perú. Exp Parasitol. 2014;145:S10-19. doi:10.1016/j.exppara.2014.05.007
55. Mulec J, Dietersdorfer E, Üstüntürk-Onan M, Walochnik J. *Acanthamoeba* and other free-living amoebae in bat guano, an extreme habitat. Parasitol Res. 2016;115:1375-83. doi:10.1007/s00436-015-4871-7
56. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Treatment/*Balamuthia*/Parasites. Atlanta: CDC; 2017. [acceso: 09/06/2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/balamuthia/treatment.html>
57. Vollmer ME, Glaser C. A *Balamuthia* survivor. JMM Case Rep. 2016;3:e005031. doi:10.1099/jmmcr.0.005031
58. Laurie MT, White CV, Retallack H, Wu W, Moser MS, Sakanari JA, et al. Functional assessment of 2,177 U.S. and international drugs identifies the quinoline nitroxoline as a potent amoebicidal agent against the pathogen *Balamuthia mandrillaris*. MBio. 2018;9:e02051-18. doi:10.1128/mBio.02051-18
59. Zamora A, Henderson H, Swiatlo E. *Acanthamoeba* encephalitis: A Case Report and Review of Therapy. Surg Neurol Int. 2014;5:68. doi: 10.4103/2152-7806.132239
60. Sütçü M, Aktürk H, Gülümser-Şişko S, Acar M, Erol OB, Somer A, et al. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in an immunocompetent child. Turk J Pediatr. 2018;60:340-3. doi:10.24953/turkjped.2018.03.019

Conflicto de intereses

No existe relación, condición o circunstancia económica o institucional que pueda afectar la objetividad en la interpretación del artículo.

Contribución de los autores

Judith Mendiola Martínez: Concepción y diseño del artículo, recolección de datos, obtención de resultados y redacción del artículo.

Yanet Fresco Sampedro: Concepción del artículo y revisión crítica de este.

Misladys Rodríguez Ortega: Concepción del artículo y revisión crítica de este.