

ARTICULO DE REVISIÓN / REVISION ARTICLE

Situación del diagnóstico de Queratitis Amebiana en Paraguay**Status of the diagnosis of Amebic Keratitis in Paraguay**Sonia Abente¹, Idalina Franco¹, Margarita Samudio¹, Rosa Guillén¹, Marco Bordón²¹Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, San Lorenzo, Paraguay.²Fundación Banco de Ojos “Fernando Oca del Valle”, Asunción, Paraguay.Correspondencia: Sonia Abente sonia_abente@hotmail.com

Recibido el 04/10/2019; aprobado para publicación el 24/10/2019

Editor responsable: Miriam Espínola-Canata

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) existen ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde el género *Acanthamoeba* es la más frecuentemente aislada en diversos ambientes del suelo, aire y agua y han sido asociadas a enfermedades en humanos. Su capacidad para vivir en ambientes adversos se debe a su baja demanda de alimentación y a que en su ciclo biológico tiene un estadio en forma de quiste, lo que la hace muy resistente. El hombre al convertirse en su hospedero, puede desarrollar infecciones en el sistema nervioso central, en la piel y los pulmones, y a nivel ocular es capaz de afectar la córnea y producir queratitis, por lo tanto es considerado un importante agente etiológico de patologías humanas. En esta revisión se aborda las siguientes características de la *Acanthamoeba spp.*, su biología, patogénesis y los mecanismos de defensa del ser humano frente a la infección por esta ameba; además, el abordaje diagnóstico microbiológico y molecular, herramienta que ha mejorado con el avance de la tecnología, indispensable para la temprana identificación y el logro una oportuna y eficaz intervención clínica y terapéutica. Finalmente exponemos la situación actual en relación a los métodos de diagnóstico con que se cuentan y los escasos reportes clínicos existentes en Paraguay.

Palabras clave: Amebas de vida libre, *Acanthamoeba sp.*, Lentes de contacto, Queratitis amebiana. Fuente DeCS

ABSTRACT

Free-living amoeba (FLA) exist widely distributed in nature, where the genus *Acanthamoeba* is the most isolated in various soil, air and water environments and has been associated with diseases in humans. Its ability to live in adverse environments is due to the low demand for food it has and that in its biological cycle has a cyst-shaped stage, which makes it very resistant. Man becoming his host, can cause infections in the

central nervous system, disseminated infections in the skin and lungs, and keratitis, becoming a very important etiological agent of human pathologies. This review addresses characteristics that are known from *Acanthamoeba spp.*, such as its biology, pathogenesis and human defense mechanisms against *Acanthamoeba* infection; In addition, the microbiological and molecular diagnosis, which is a tool that has improved with the advancement of technology and are essential for timely identification and thus achieve a good clinical and therapeutic intervention. Finally, we present the current situation in Paraguay regarding the few existing clinical reports and the diagnostic methods available.

Key words: Free-living amoebas, *Acanthamoeba sp.*, Contact lenses, Amebic keratitis. Source NLM

INTRODUCCIÓN

La *Acanthamoeba* es un protozooario oportunista, de vida libre, vive en el suelo y en todo tipo de agua (dulce y salada), e incluso en fluidos biológicos como la saliva. Por esta razón, las oportunidades de una potencial infección son elevadas ⁽¹⁾. Por su gran ubicuidad no es sorprendente que entren en contacto con los seres humanos y causar infecciones ⁽²⁻⁴⁾. Entre las especies más comunes capaces de provocar afectación ocular provocando infecciones corneales se pueden mencionar a *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyssodes*, *A. griffini*, *A. quina* y *A. lugdunensis* ⁽⁵⁾.

La queratitis por *Acanthamoeba* (QA) fue descrita por primera vez en Estados Unidos en 1973, en un caso post trauma corneal. Se hablaba de una epidemia, debido al aumento del número de casos por el uso masivo de los lentes de contacto, tanto con fines terapéuticos como también cosméticos. La asociación entre el uso de lentes de contacto (LC) y QA fue descrita en 1984. Al principio se describió que el principal factor de riesgo era el uso de LC en

ambientes con agua contaminada. Posteriormente se encontró que esta queratitis estaba asociada también al uso de solución salina de dilución casera empleada para la asepsia de los LC. Todos los tipos de LC han sido asociados a QA, pero son los LC blandos (LCB) de uso diario y uso prolongado los que presentan un riesgo mayor. Esta infección puede ocurrir también en no usuarios de LC^(1,6).

El estándar de oro para diagnosticar la presencia de *Acanthamoeba* es el cultivo que utiliza un agar no nutritivo ANN (monoxénico), la muestra es colocada en la placa de agar no nutritivo al 2%, cubierta con una microcapa de *Escherichia coli* (0.5 Mc Farland, aproximadamente). Se emplea el agar base como solidificante y la solución Page para el cultivo⁽⁷⁾. La técnica de cultivo permite la identificación morfológica y su clasificación según las claves de Page, 1988⁽⁸⁾, pero presenta limitaciones que pueden dar lugar a una demora en el diagnóstico debido al prolongado tiempo de incubación o a un diagnóstico equivocado. Un retraso en el diagnóstico se asocia a un peor pronóstico visual y una evolución más prolongada de la enfermedad⁽⁹⁾; por lo que son las técnicas moleculares las que permiten, mediante la amplificación de fragmentos específicos, identificar y realizar estudios epidemiológicos rápidos de género, especie, genotipo y subgenotipo. En 1992, Vodkin et al., diseñaron una Reacción en Cadena de la Polimerasa, cuya sigla proviene de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction (PCR), que además de diferenciar las especies, diferencia su patogenicidad⁽¹⁰⁾. Más tarde, Gast et al. determinaron la secuencia genética completa de la subunidad de ARN ribosomal nuclear y propuso un sistema de clasificación basado en esta secuencia⁽¹¹⁾.

En Paraguay existe un solo reporte de un caso clínico de queratitis por *Acanthamoeba* en usuaria de LC en el 2005⁽¹²⁾. La falta de estudios sobre este microorganismo causante de queratitis y el gran incremento de usuarios de LC hacen imperiosa la necesidad de contar con más datos de la situación actual de morbilidad que generan estos microorganismos en Paraguay.

TAXONOMÍA

Acanthamoeba es una ameba de vida libre que pertenece a la familia *Acanthamoebidae*, descrita por primera vez en 1930 como contaminante de un cultivo de hongos *Cryptococcus parvoseus* y clasificado como el género de *Hartmannella*, con el nombre de *Hartmannella castellani*. Fue separado del género *Hartmannella* y se estableció la familia *Acanthamoebidae* y el género *Acanthamoeba* por el movimiento lento ameboideo y “acanth” que en griego

significa picos, por las estructuras espinosas o acanthopodios^(5,13). En 1977, el género fue sub-dividido en tres grupos en base al tamaño y las características morfológicas de los quistes. El grupo I incluye a aquellos que presentan trofozoitos y quistes grandes, con endoquistes en forma estrellada y ectoquistes lisos o rugosos con un tamaño aproximado de 18µm. En el grupo II se incluyeron aquellas amebas con quistes menores a 18µm, los endoquistes de este grupo se pueden presentar de forma poligonal, triangular redondo u ovalado y los ectoquistes de forma rugosa. Los del grupo III presentan quistes con diámetro menor a 18µm con endoquistes redondeados y ectoquistes delgados y ondulados. Esta clasificación resulta un tanto confusa debido a que la forma de los quistes puede cambiar por las condiciones del cultivo incluso en la misma especie. Actualmente la clasificación se basa en la secuencia del gen de la 18s rRNA⁽²⁾.

Ciclo evolutivo

Acanthamoeba presenta dos formas dentro de su ciclo evolutivo: el trofozoito y quiste. El trofozoito es la forma metabólicamente activa, su tamaño oscila entre 12-35 µm de diámetro dependiendo de la especie, posee estructuras similares a espinas en la superficie llamadas acanthopodios (**Fig. 1.A**), que son muy importantes y cumplen diversas funciones como locomoción, captura de alimentos y adhesión a superficies biológicas o inertes. Posee vacuolas contráctiles y un único núcleo, se alimenta activamente de bacterias, hongos, algas y compuestos orgánicos que encuentra en el medio. La captura de los alimentos la realiza por fagocitosis o pinocitosis. Las condiciones que favorecen el estado de trofozoito son las siguientes: temperatura entre 30-37 °C, osmolaridad entre 50-80 mOsmol, pH neutro y suministro abundante de alimentos. Se reproduce por fisión binaria^(13,14).

En condiciones adversas como privación de alimentos, cambios de pH o desecación, el trofozoito pasa a la forma quística (**Fig. 1.B**), expulsando el exceso de alimentos, agua y material particulado, se condensa y adquiere una forma redondeada de pared doble; una interna (endoquiste) y otra externa (ectoquiste). Esta es una forma resistente, que permite que el parásito sobreviva en condiciones hostiles. Puede resistir a la actividad biocida, cloración, radiaciones gamma o ultravioleta y la presencia de diversos compuestos como los antibióticos. Los quistes poseen poros para controlar los cambios del medio, cuando percibe un ambiente favorable emerge del quiste el trofozoito y se reproduce activamente completando así el ciclo. El tamaño de los quistes oscila entre 12-20 µm según la especie⁽¹³⁾.

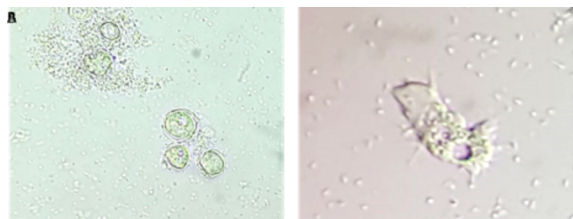


Figura 1. Imagen de *Acanthamoeba*. A) Quistes con doble pared. B) Trofozoito con numerosos acanthopodios, vacuolas y un único núcleo.

PATOGENICIDAD

Los protozoarios del género *Acanthamoeba* son considerados patógenos oportunistas y producen enfermedades que si bien son poco frecuentes, pueden ser fatales. Las patologías asociadas a este género son: la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), queratitis amebiana (QA), lesiones cutáneas como granulomas en la piel y otros tejidos. En 1958 se demostró por primera vez la capacidad patogénica de estas amebas tras observar el efecto citopático producido en estudios *in vitro* en células de riñón de mono y la muerte en animales de laboratorio *in vivo* (15-17).

QUÉRATITIS AMEBIANA

La QA causada por especies de *Acanthamoeba* es muy dolorosa y amenaza la visión si no se diagnostica y trata a tiempo (Fig. 2). El principal factor de riesgo para adquirir la infección es el uso de LC. Los casos de QA en pacientes que no son usuarios de LC a menudo se relacionan con traumatismos oculares y exposición posterior al parásito a través de agua o suelo contaminado (18-20). Las amebas llegan a los estuches de LC por prácticas de higiene inadecuada como limpieza de las lentes con agua de canilla o bañarse en ríos portando las lentes; esto debido al desconocimiento del usuario, favoreciendo así la contaminación de los mismos. Las amebas pueden multiplicarse hasta altas densidades y a través de las LC alcanzar la córnea causando la infección (3,21).

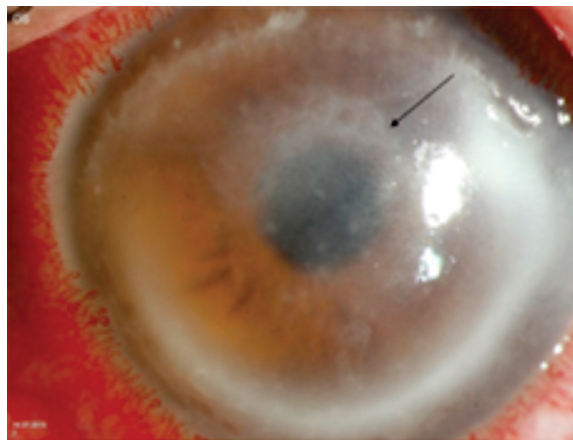


Figura 2. Queratitis amebiana. Infiltrado en anillo incompleto (flecha) e infiltrados estromales multifocales en Queratitis por *Acanthamoeba*. Extraído de Szentmáry 2019(22).

Cada vez se reportan más casos de QA que ponen en peligro la visión. Se estima una prevalencia de 1,2 por millón de adultos y con cifras que varían de 0,2 a 2 por cada 100.000 usuarios de LC por año en países como EEUU y el Reino Unido (21,23). Los síntomas más comunes incluyen dolor, fotofobia, enrojecimiento, sensación de cuerpos extraños, visión borrosa. Los hallazgos anatomopatológicos más frecuentes son; infiltrados epiteliales, perineuritis, estroma en anillo, úlceras epiteliales, perforación corneal, entre otros. Cabe resaltar que ninguno de estos hallazgos es específico de QA. Si bien la infección es principalmente corneal, en algunos casos pueden presentarse manifestaciones extracorneales como glaucoma, cataratas, escleritis, atrofia del iris e inflamación del segmento posterior (18,24).

Los usuarios de LC corren mayor riesgo de adquirir QA por los malos hábitos que realizan, lo cual favorece la formación de biopelículas bacterianas que juegan un rol importante en la adherencia y colonización de las LC por *Acanthamoeba*, en la Fig. 3 se observa un esquema representativo del desarrollo de la infección corneal asociada a LC. Estudios previos han demostrado que los usuarios no toman las precauciones necesarias para evitar la contaminación de sus LC; Chang y colaboradores reportaron que de la población estudiada apenas el 28% cumplen las buenas prácticas. Otro estudio realizado por Ghanem y colaboradores reportó que el 88,6% de los usuarios de LC no las utiliza según los estándares de uso y descartabilidad recomendados. Los factores de riesgo más destacados son la falta de higiene de las manos, de las lentes y el estuche, incumplimiento en el periodo de reemplazo tanto de las lentes como del estuche, nadar o ducharse con LC puestos, lavado o almacenamiento de LC con agua de grifo y reutilización de LC sin haber realizado una desinfección previa (13,25,26).

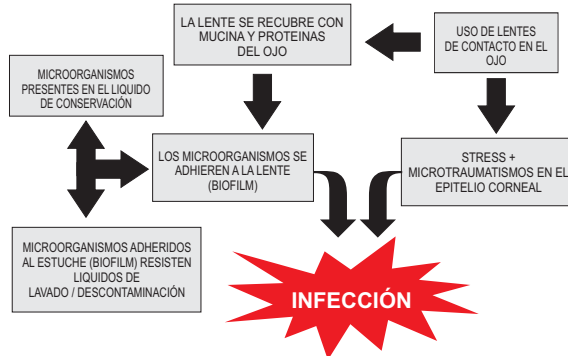


Figura 3. Desarrollo de queratitis infecciosa en usuarios de LC. Extraído de Nicola 2005(27)

Para evitar complicaciones relacionadas al uso de LC se recomienda a los usuarios realizar una limpieza y desinfección diaria de las lentes y su estuche, seguir las recomendaciones de uso y reemplazo de LC establecidos por los oftalmólogos, evitar uso de agua de grifo como solución de lavado o almacenamiento,

realizar una desinfección de las LC antes de guardarlo en su estuche, no exceder las horas de uso recomendadas, evitar dormir con LC puestos y realizar la consulta médica al menos una vez al año. El médico debe explicar al paciente las complicaciones que implican el uso incorrecto de LC y en cada consulta recordarle los buenos hábitos que debe mantener⁽²⁸⁾.

Mecanismos de patogenicidad: Existen factores que contribuyen directa e indirectamente a la patogenicidad.

Factores que contribuyen directamente a la patogenicidad: El primer paso para adquirir la infección corneal está mediado por proteínas de unión a la manosa (MBP) expresadas en la superficie de *Acanthamoeba* de aproximadamente 130 KDa, otras adhesinas implicadas son las proteínas de unión a laminina de 28,2 kDa y 55 kDa. El reconocimiento primario de la MBP con su receptor interfiere en la señalización intracelular de la célula huésped y conduce a eventos secundarios como la inhibición del ciclo celular a través de inhibición de la síntesis de ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas que codifican proteínas para la progresión del ciclo celular induciendo de esa forma la muerte celular^(21,29).

Por otra parte la muerte celular también puede estar mediada por la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) que induce la liberación del citocromo c, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, activación de Bad, Bax y caspasas que son mediadores de la apoptosis. La unión del parásito a la célula huésped induce a la activación de toxinas como neuraminidasas, ecto-ATPasas, superóxido dismutasa, elastasas, proteasas, entre otros. Las ecto-ATPasas, hidrolizan el ATP y el ADP resultante ejerce un efecto tóxico sobre la célula corneal, activa la caspasa-3 e induce a la apoptosis⁽¹³⁾.

Las neuraminidasas podrían jugar un papel importante en la colonización de las amebas y al daño del epitelio corneal. Las superóxido dismutasas identificadas en *Acanthamoeba* son dos; la superóxido dismutasa de hierro y la superóxido dismutasa de cobre y zinc que actúan como antioxidantes y antiinflamatorios, lo cual favorece la supervivencia de las amebas del estrés oxidativo⁽²¹⁾.

Acanthamoeba tiene la capacidad de activar el plasminógeno para formar plasmina que conduce a la activación de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular. La elastasa producida por éste parásito degrada proteínas del tejido conectivo tales como fibrina y colágeno. Las proteasas tales como el MIP 133 que es una serina proteasa induce la degradación de queratocitos, células epiteliales y endoteliales corneales, células del cuerpo ciliar del iris, células

epiteliales del pigmento retiniano, así como la inducción de la apoptosis en los macrófagos⁽³⁰⁾.

Los receptores tipo Toll 4 (TLR4) participan en el reconocimiento de *Acanthamoeba* que a través de la proteína adaptadora MyD88 activa al factor nuclear-kappa B para la transcripción de proteínas mediadoras de la inflamación como citocinas, interleucina-8, interferón beta y factor de necrosis tumoral alfa en células corneales⁽¹⁴⁾.

Factores que contribuyen indirectamente a la patogenicidad: Entre otros factores que contribuyen a la patogenicidad de *Acanthamoeba* podemos citar: tamaño del inóculo, la capacidad del parásito de sobrevivir fuera del huésped en diferentes condiciones ambientales (osmolaridad, tolerancia a la temperatura y pH), resistencia a drogas, características morfológicas, quimiotaxis, ubicuidad entre otros. *Acanthamoeba* modula su unión a superficies biológicas a través de los *acanthapodios* y a través de la diferenciación celular de trofozoitos a quistes puede resistir a diversos agentes antimicrobianos. Por quimiotaxis el parásito se mueve hacia una mayor concentración de alimentos y huye de un ambiente amebicida dirigiendo su movimiento según las sustancias químicas presentes en el medio. Se cree que las biopelículas formadas en el estuche de lentes de contacto podrían jugar un papel importante en la contaminación por *Acanthamoeba*, ya que las mismas sirven como fuente de nutrientes para las amebas. Ciertos factores del huésped también influyen en la patogenicidad del parásito, entre los cuales podemos mencionar: susceptibilidad del huésped, factor lagrimal como la IgA anti-*Acanthamoeba* y especificidad tisular⁽²¹⁾.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la QA es un desafío ya que los síntomas son poco específicos siendo muy similares a queratitis de otra etiología, en la mayoría de los casos tienden a confundirse con queratitis fúngica o herpética lo que retrasa significativamente el diagnóstico y los pacientes son sometidos a semanas de tratamiento antimicrobiano ineficaz. En muchos casos incluso la enfermedad puede desarrollarse como una infección mixta dificultando más aún su diagnóstico^(31,32).

El diagnóstico temprano y correcto es fundamental para lograr un mejor pronóstico y asegurar el tratamiento adecuado y eficaz. El laboratorio es esencial para la detección del patógeno y por tanto es clave el diagnóstico etiológicamente correcto en casos de QA. Sin embargo, los métodos diagnósticos convencionales para detección de *Acanthamoeba* carecen de sensibilidad por lo que es necesario contar

con técnicas moleculares altamente sensibles y específicas para un diagnóstico correcto y preciso^(33,34).

Métodos de diagnóstico: El diagnóstico se puede realizar a través del cuadro clínico que presenta el paciente, la microscopia confocal y los métodos laboratoriales de cultivo y molecular.

Microscopía confocal: Es una herramienta médica útil para el diagnóstico de la QA, no es invasiva, permite una rápida visualización de las estructuras oculares y es particularmente útil en los casos de queratitis donde el infiltrado corneal es profundo e inaccesible al raspado corneal. Sin embargo, no permite discriminar el organismo real causante de la infección por lo que es necesario realizar pruebas confirmatorias de laboratorio. Cabe resaltar que es muy dependiente de la experiencia del observador ya que los trofozoitos son muy similares a los queratocitos y leucocitos de la córnea pudiendo confundirse fácilmente si no es realizado por un personal experto. Además presenta un valor limitado en infecciones donde la densidad del parásito es baja generando resultados falsos negativos, como lo demostraron Padzik y colaboradores que reportaron el crecimiento de *Acanthamoeba* en muestras inicialmente negativas por microscopía confocal^(18,31).

Cultivo: La técnica de cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico. Sin embargo, puede carecer de sensibilidad y lleva un tiempo prolongado pudiendo llegar hasta 7 días para la detección del parásito o incluso no obtener crecimiento aún en presencia del protozoario en la muestra⁽²¹⁾. La sensibilidad del cultivo depende de múltiples factores como el tipo de muestra y la cantidad, así como el tiempo que transcurre desde la colecta del material hasta su procesamiento, ya que se requiere al menos un microorganismo viable para que se reproduzca hasta cantidades suficientes para poder ser detectada. Otro factor importante a tener en cuenta es si el parásito se encuentra en la forma quística o de trofozoitos; los quistes tardan en cambiar a trofozoitos y reproducirse lo cual retrasa el diagnóstico por cultivo⁽³³⁾.

En un estudio realizado por Walochnik y colaboradores, se observó que en las muestras de pacientes que recibieron tratamiento antimicótico o antibiótico tardaban más en detectar el parásito y en algunos casos los cultivos permanecieron negativos por completo, mientras que al realizar un seguimiento del paciente a medida que avanzaba con el tratamiento observaron una variada sensibilidad respecto a las muestras iniciales de 85% (primera muestra) a 10% (muestras de seguimiento) por el método de cultivo, lo que sugiere la necesidad de contar con métodos más sensibles y específicos para asegurar la detección del parásito⁽³⁵⁾.

Métodos moleculares: Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen como principales ventajas su gran sensibilidad, especificidad y su rapidez, además del hecho de requerir poca cantidad de muestra^(21,31).

Existen varios estudios centrados en la amplificación del gen de la 18s rRNA y que permiten detectar todas las variantes de *Acanthamoeba*. El gen 18s rRNA es parte de una unidad ribosómica repetitiva que se encuentra en múltiples copias en 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⁽³⁶⁾.

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 patógeno⁽²⁴⁾.

TRATAMIENTO

El tratamiento de la QA es prolongado y agresivo sobre todo para eliminar los quistes altamente resistentes. No existe un tratamiento único, generalmente se aplica una combinación de fármacos como las biguanidas en combinación con diamidinas y se obtienen buenos resultados si se aplican al principio del desarrollo de la infección. El tratamiento es muy riguroso, la aplicación del fármaco se debe realizar cada hora durante los primeros días de terapia por un periodo de tres días, dependiendo de la respuesta la aplicación del fármaco se reduce a cada tres horas y requiere de un mínimo de tres a cuatro semanas pudiendo llegar a seis o doce meses de tratamiento en infecciones más severas, en muchos casos el paciente se ve obligado a abandonar la terapia por intolerancia al fármaco o las reacciones adversas^(21,29,37).

Cuando el paciente no responde al tratamiento con fármacos anti-*Acanthamoeba* y la infección ha progresado a una infiltración profunda como perforación corneal, se indica el tratamiento quirúrgico como única solución. Antes de realizar la queratoplastia el paciente debe ser sometido a una terapia anti-amebiana y continúa posterior a la operación para evitar la recurrencia de la infección. En muchos casos la córnea trasplantada vuelve a infectarse por remanentes de quistes que quedaron en el tejido, en el peor de los casos puede requerir enucleación. En un estudio previo realizado en Austria por Walochnik y colaboradores reportaron el caso de un paciente que fue sometido dos veces a trasplante de la córnea, otro paciente tuvo que ser sometido cuatro

veces al trasplante corneal para despejar completamente *Acanthamoeba* de su ojo. La dificultad para eliminar completamente el parásito se debe a los quistes altamente resistentes. Otro estudio realizado por Antonelli y colaboradores reportó el caso de un paciente que seguía dando positivo por cultivo y PCR tras ser sometido a 8 meses de terapia continua, lo que demuestra la alta persistencia y resistencia de *Acanthamoeba*^(24,35,38).

El uso de corticoides está indicando para controlar la inflamación pero debe administrarse dos semanas posterior al inicio del tratamiento con biguanidas, sin suspender ésta y seguir con el tratamiento con el anti-*Acanthamoeba* en dosis bajas por cuatro semanas tras suspender los corticoides, si en ese periodo de cuatro semanas el ojo ha estado libre de inflamación se puede considerar que está curado y suspender todas las terapias⁽¹⁸⁾.

SITUACIÓN EN PARAGUAY

En Paraguay, existen pocos datos sobre queratitis en general, con un predominio de infecciones causadas por bacterias y hongos. Un estudio retrospectivo de 13 años de queratitis microbiana reportó como agentes causales a bacterias en el 51% de los casos, hongos en el 26% e infecciones mixtas (bacterias y hongos) en 23%. Estudios más recientes reportan que aproximadamente el 55% de los casos está asociado a hongos y 45% a bacterias. Las bacterias más comúnmente aisladas son *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos coagulasa negativa, mientras que *Fusarium sp.* es el agente micótico más común aislado. El único antecedente de queratitis causada por *Acanthamoeba* que existe a nivel nacional es el reporte de un caso clínico en el cual se detectó el parásito a partir de raspado corneal por el método de cultivo^(12,39-43).

En el país, no se cuenta con un protocolo estandarizado para detección de *Acanthamoeba*, generando una necesidad de métodos de diagnóstico que permitan detectar al parásito en casos sospechosos. El departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), con el fin de contribuir al diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de las infecciones amebianas, ha estandarizado métodos diagnósticos basados en PCR para la detección rápida y específica de *Acanthamoeba sp.* tomando al cultivo como estándar de oro.

Se estandarizaron con éxito el método de cultivo en medio Page, 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, por método de cultivo, mientras que la carga parasitaria en el líquido conservante fue inferior a los límites de detección de los métodos moleculares. El ADN obtenido del cultivo de dicha muestra fue positivo para *Acanthamoeba* en los tres sistemas de PCR. El uso combinado de técnicas convencionales y moleculares fue efectivo para la detección de *Acanthamoeba* en líquidos conservantes de lentes de contacto con frecuencia relativamente baja comparado con otros estudios⁽⁴⁴⁾.

En el Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología del 2019, se presentaron tres casos con sospecha clínica de queratitis por *Acanthamoeba spp.* en usuarios de lentes de contacto, dos de sexo femenino; todos consultaron por ojo rojo, dolor, fotofobia y disminución de la agudeza visual. La primera paciente de 13 años fue tratada como queratitis herpética sin mejoría. Ante la sospecha de queratitis amebiana, se inició tratamiento con polihexametilbiguanida 0,02%/clorexidina 0,02%, con buena evolución a los 2 meses de tratamiento. No se realizó estudio laboratorial. En el segundo caso, la paciente de 26 años, por la sospecha clínica y hábito de ducharse con lentes de contacto puestas, se envió el líquido de conservación para estudio laboratorial, arrojando PCR positiva para *Acanthamoeba*; iniciándose tratamiento específico con buena evolución. En el tercer paciente de 62 años, tratado como cuadro infeccioso con moxifloxacina por un mes sin mejoría, se realiza cultivo y PCR del líquido de conservación de la lente de contacto, dando positivo por ambas técnicas para *Acanthamoeba*, además por sospecha de neoplasia se le realizó biopsia. Actualmente recibe tratamiento para neoplasia por el resultado histopatológico. La importancia de este reporte radica en que las queratitis amebianas pueden simular cuadros infecciosos de carácter viral herpético o micótico, y por su baja frecuencia y difícil confirmación por falta de métodos laboratoriales apropiados, no se considera a la *Acanthamoeba* como agente etiológico, y en consecuencia hay retraso en el diagnóstico y tratamiento⁽⁴⁵⁾.

Así mismo, en el año 2018 mediante otro estudio se determinó la frecuencia de malas prácticas en el uso de lentes de contacto en 110 estudiantes (edad media: 23 ± 3 años, 81,8% del sexo femenino) de la Universidad Nacional de Asunción, aparentemente sanos. El 97% de los participantes declaró realizar al menos una mala práctica que favorece contaminación de las lentes de contacto que fueron: uso diario (43,6%), exposición de las lentes de contacto al agua mientras se duchan (70%) o nadan en piscinas (43,6%), lavado de las lentes con agua de canilla (11,8%), falta de lavado de manos para manipular las lentes (6,4%), uso de lentes de contacto vencidos (40,9%), uso de lentes más de 10

horas diarias (48,2%), lavado poco frecuente del estuche de lentes de contacto (50%) y falta de cambio diario de la solución de lentes de contacto (70%). La alta frecuencia de malas prácticas sugiere la necesidad de implementar medidas educativas dirigidas a esta población tan vulnerable, a fin de prevenir el desarrollo de queratitis infecciosa⁽⁵²⁾.

CONCLUSIÓN

La baja prevalencia de los casos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. se debe probablemente a que esta ameba es subestimada como agente etiológico de esta patología, lo que desemboca en un erróneo y tardío diagnóstico con una evolución desfavorable para la salud visual del paciente. Siendo por ello un desafío para el oftalmólogo y para el laboratorio su correcto diagnóstico y tratamiento, donde la sospecha de la

misma debería ser mayor al tener una población de pacientes usuarios de lente de contacto con alta popularidad de uso, ya sea con fines terapéuticos o simplemente estéticos y donde los buenos hábitos de higiene de los lentes de contacto, sus líquidos de conservación y sus estuches no se cumplen a cabalidad.

Antes de los trabajos realizados en el departamento de Microbiología del IICS, en el país no se contaba con ningún método de diagnóstico laboratorial para la detección de *Acanthamoeba* spp., siendo los mismos, los primeros en estandarizar los métodos convencionales y molecular para ser utilizados como útiles herramientas para el oportuno diagnóstico de esta patología, así como el estudio del comportamiento sobre los hábitos de higiene en los usuarios sanos de lentes de contacto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Landeo LL. Diagnóstico y tratamiento de queratitis por *Acanthamoeba*. Rev Horiz Méd. 2012;12(4):6-11.
2. Castrillón JC, Orozco LP. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Rev Chil Infectol. 2013;30(2):147-55.
3. Padzik M, Starościak B, Szaflik JP, Pietruczuk-Padzik A, Siczek P, Chomicz L. Assessment of in vitro dynamics of pathogenic *Acanthamoeba* strains originating from contact lens wearers with infectious keratitis. Ann Parasitol. 2016;62(4):331-6.
4. Gomes T dos S, Magnet A, Izquierdo F, Vaccaro L, Redondo F, Bueno S, et al. *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. Wallace GR, editor. PLOS ONE. 2016;11(4):e0154246.
5. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clin Microbiol Rev. 2003;16(2):273-307.
6. Jercic MI. [Free living Amoeba of *Acanthamoeba* genus]. Rev Chil Infectologia Organo Of Soc Chil Infectologia. 2007;24(6):491-2.
7. Cabello-Vilchez AM. *Acanthamoeba* spp. Un agente oportunista en infecciones humanas. *Acanthamoeba* spp. An opportunistic agent human infections. Rev Investigación Univ Norbert Wien. 2015;(4):11-32.
8. Page FC. A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1988. 122 p.
9. Castaño-Osorio JC. Case report of *Acanthamoeba* keratitis, its clinical isolation and successful treatment with antiseptics in the department of Quindio; and its literature review. Short Title: A case of keratitis by *Acanthamoeba* in Quindio. Rev Invest Univ Quindio. 2009;(19):165-71.
10. Vodkin MH, Howe DK, Visvesvara GS, McLaughlin GL. Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. J Protozool. 1992;39(3):378-85.
11. Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ. Subgenus Systematics of *Acanthamoeba*: Four Nuclear 18S rDNA Sequence Types. J Eukaryot Microbiol. 2007;43(6):498-504.
12. Molas LR, Kang H, Lugo RA, Fariña N, Sanabria R, Kaspar HM de. Queratitis por *Acanthamoeba* sp. Reporte de caso. An Fac Cienc Médicas. 2015;38(3):44-7.
13. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):564-95.
14. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors. 2012;5:6.
15. Kong HH. Molecular phylogeny of acanthamoeba. Korean J Parasitol. octubre de 2009;47 Suppl:S21-28.
16. Martín Cabello Vilchez. *Acanthamoeba* spp. un agente oportunista en infecciones humanas. Rev Investig Univ Norbert Wien. 2015;(4):32.
17. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. J Eukaryot Microbiol. 2013;60(6):626-33.
18. Garg P, Kalra P, Joseph J. Non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. Indian J Ophthalmol. 2017;65(11):1079-86.
19. Hajjalilo E, Niyyati M, Solaymani M, Rezaeian M. Pathogenic Free-Living Amoebae Isolated From Contact Lenses of Keratitis Patients. Iran J Parasitol. 2015;10(4):541-6.
20. Zhong J, Li X, Deng Y, Chen L, Zhou S, Huang W, et al. Associated factors, diagnosis and management of *Acanthamoeba* keratitis in a referral Center in Southern China. BMC Ophthalmol. 2017;17(1):175.
21. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite Paris Fr. 2015;22:10.
22. Szentmáry N, Daas L, Shi L, Laurik KL, Lepper S, Milioti G, et al. *Acanthamoeba* keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment. J Curr Ophthalmol. 2019;31(1):16-23.
23. Page MA, Mathers WD. *Acanthamoeba* keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. J Ophthalmol. 2013;2013:670242.
24. Freitas D de, Carvalho FR de S. What is the best therapeutic scheme for *Acanthamoeba* keratitis? Vis Pan-Am Pan-Am J Ophthalmol. 2014;13(3):78-81.
25. Coral Ghanem C, Coral Ghanem R, Bortoli GW de, Yamazaki ES. The behavior and characteristics of contact lens wearers among university students in health related areas. Arq Bras Oftalmol. 2000;63(2):123-7.
26. Cheng Mun Yee, Lim Yi Xuan, Kavitha A/P Govindarajan, Tan Jia Ming, Tai Ken Lin, Vimala Thambypillai. Knowledge, practices and compliance during contact lens wear among students in SEGi University Kota Damasara, Selangor. SEGi Rev. 2013;6.

27. Nicola F. Queratitis infecciosa no viral: factores predisponentes, agentes etiológicos y diagnóstico de laboratorio. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37(4):229-39.
28. Garrochotegui Manuel, Rojas María, Serrano Horacio, Garrochotegui Myriam. Lentes de Contacto: Historia, Tipos y Complicaciones de su Uso. *INFORMED.* 2009;Vol. 11(2).
29. Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. *Ocul Surf.* 2010;8(2):70-9.
30. Carni N, Stapleton F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic Physiol Opt J Br Coll Ophthalmic Opt Optom.* 2016;36(2):77-92.
31. Claire Low A, Coyne M, Jones B, Anijeet D. *Acanthamoeba* keratitis: improving the Scottish diagnostic service for the rapid molecular detection of *Acanthamoeba* species. *J Med Microbiol.* 2015;64(7):682-7.
32. Mascarenhas J, Lalitha P, Prajna NV, Srinivasan M, Das M, D'Silva SS, et al. *Acanthamoeba*, fungal, and bacterial keratitis: a comparison of risk factors and clinical features. *Am J Ophthalmol.* 2014;157(1):56-62.
33. Goh JWY, Harrison R, Hau S, Alexander CL, Tole DM, Avadhanam VS. Comparison of In Vivo Confocal Microscopy, PCR and Culture of Corneal Scrapes in the Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. *Cornea.* 2018;37(4):480-5.
34. Niyayati M, Lasgerdi Z, Lorenzo-Morales J. Detection and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae from Water Sources in Kish Island, Southern Iran. *Microbiol Insights.* 2015;8(Suppl 1):1-6.
35. Walochnik J, Scheikl U, Haller-Schober E-M. Twenty Years of *Acanthamoeba* Diagnostics in Austria. *J Eukaryot Microbiol.* 2015;62(1):3-11.
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(10):3589-95.
37. Pacella E, La Torre G, De Giusti M, Brillante C, Lombardi AM, Saldone G, et al. Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* 2013;7:991-4.
38. Antonelli A, Favuzza E, Galano A, Montalbano Di Filippo M, Ciccone N, Berrilli F, et al. Regional spread of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis in Italy. *New Microbiol.* 2018;41(1):83-5.
39. Laspina F, Samudio M, Cibils D, Ta CN, Fariña N, Sanabria R, et al. Epidemiological characteristics of microbiological results on patients with infectious corneal ulcers: a 13-year survey in Paraguay. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 2004;42(3):204-9.
40. Arrúa M, Laspina F, Samudio M, Fariña N, Cibils D, Sanabria R, et al. Infectious keratitis: clinical and microbiological characteristics. 2003-2006 period. *Mem Inst Investig En Cienc Salud.* 2008;6(1):05-14.
41. Laspina F, Samudio M, Arrúa M, Fariña N, Cibils D, Sanabria R, et al. Bacterial corneal ulcer: ethiological agents, antimicrobial susceptibility and treatment. *Mem Inst Investig En Cienc Salud.* 2009;7(1):13-9.
42. Duré C, Samudio M, Abente S, Fariña N, Laspina F. Diagnostic utility of Gram staining for infectious keratitis. *Rev Científica UCSA.* 2017;4(3):12-9.
43. Samudio M, Laspina F, Fariña N, Franco A, Mino de Kaspar H, Giusiano G. Queratitis por *Lasiodiplodia theobromae*: comunicación de un caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infectol.* 2014;31(6):750-4.
44. Franco I, Abente S, Guillén R, Samudio M. Técnicas convencionales y moleculares en la detección de *Acanthamoeba* sp. en líquidos de conservación de lentes de contacto. *Revista del Instituto de Medicina Tropical.* 2019;14:50.
45. Abente S, Franco I, Guillén R, Samudio M, Duré C, Laspina F, et al. Queratitis por *Acanthamoeba* sp. en usuarios de lentes de contacto: Casos clínicos. *Revista del Instituto de Medicina Tropical.* 2019;14:45.
46. Franco I, Abente S, Guillén R, Samudio M. Comportamiento de riesgo para adquirir queratitis infecciosa relacionado al uso de lentes de contacto en estudiantes universitarios. *Revista del Instituto de Medicina Tropical.* 2019;14:30.