



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

MENINGOENCEFALITIS POR AMEBAS DE VIDA
LIBRE EN EL HOSPITAL CAYETANO HEREDIA

ABRIL 2018 – MAYO 2019

Nombre del Autor: ISSELA MILAGROS MACHACA MENDEZ

Nombre del Asesor: Dra. DALILA YOLINDA MARTÍNEZ MEDINA

LIMA – PERÚ

2019

Resumen:

Las amebas de vida libre son parásitos protozoarios ambientales que producen infecciones del sistema nervioso central (SNC) de curso agudo, subagudo o crónico y generalmente con desenlace fatal. Las especies de amebas de vida libre reconocidas como patógenos humanos son *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata*. Estos agentes proliferan predominante con temperaturas $\geq 30^{\circ}\text{C}$, como sucede en áreas tropicales y subtropicales. La infección es adquirida por el contacto con fuentes de aguas contaminadas, pobre sistema de sanitación o irrigación nasal. Los pacientes se presentan con cuadros clínicos indistinguibles de aquellos causados por virus, bacterias u hongos, llevando al retraso del diagnóstico y tratamiento empírico oportuno. El diagnóstico de estos agentes permanece mayormente indeterminado por la imposibilidad de identificar estos agentes en las pruebas habituales, por la ausencia de sospecha clínica y laboratorios de referencia donde se realicen las pruebas específicas para la identificación de estos agentes. Al ser nuestro país es uno de los que reporta la mayor cantidad de casos a nivel mundial, se planea conducir un estudio transversal con la finalidad de determinar la frecuencia y características clínicas y epidemiológicas de las infecciones del SNC por amebas de vida libre, en pacientes atendidos en los servicios de hospitalización de Medicina, Emergencia y Enfermedades Infecciosas y Tropicales del Hospital Cayetano Heredia (HCH) entre enero del 2019 y febrero del 2020.

Keywords: Amebas de vida libre, meningitis, meningoencefalitis amebiana primaria, infecciones del sistema nervioso central, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata*.

Introducción:

Las amebas de vida libre (AVL) son parásitos protozoarios ambientales con capacidad de producir afección en humanos. Su presentación clínica incluye infecciones del sistema nervioso central (SNC) de curso agudo, subagudo o crónico, poco frecuente y generalmente con desenlace fatal. Las especies de amebas de vida libre reconocidas como responsables de estos cuadros humanos son *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata*. Estos agentes proliferan predominante con temperaturas $\geq 30^{\circ}\text{C}$, como sucede en áreas tropicales y subtropicales, donde la infección es adquirida por el contacto con fuentes de aguas contaminadas, pobre sistema de sanitación o irrigación nasal. (1-5) Los cuadros clínicos son indistinguibles de aquellos causados por virus, bacterias u hongos, llevando al retraso del diagnóstico y tratamiento empírico oportuno.(6)

Las infecciones del sistema nervioso central, como la meningitis y encefalitis, son los padecimientos más graves y dañinos por sus consecuencias, que incluyen secuelas, invalidez e incluso la muerte.(7) Los agentes causales más frecuentes son de etiología viral, seguidas por las infecciones bacterianas.(7-9) Sin embargo, en gran porcentaje el agente causal sigue permaneciendo desconocido (~80%)(10), lo cual contribuiría también a la importante morbimortalidad asociada. Durante los últimos años se han observado la aparición con mayor frecuencia de nuevos agentes patógenos, con gran capacidad virulenta y pobre pronóstico, como son las amebas de vida libre.(11-15) Estas infecciones se viene convirtiendo en un problema de salud pública en algunas localizaciones la última décadas, con la aparición de nuevos brotes e incremento en el número de casos en diferentes áreas con clima tropical y sub-tropical, como el recientes brotes ocurridos en Maryland, Orlando, South Carolina and New York, US.(11) ¹² Perú es uno de los países que reporta la mayor cantidad de casos a nivel mundial(16-21) y durante los últimos años se ha observado un incremento inusitado de casos identificados en nuestra institución (comunicación personal). Otros factores como el calentamiento global y la contaminación de las fuentes de agua en una población en crecimiento constante como la que se viene observando en diferentes regiones,(14, 15), especialmente en países en vías de desarrollo como el nuestro, favorecen el ambiente propicio para el desarrollo y multiplicación de estos protozoarios.(22, 23)

Por otro lado, el diagnóstico de las afecciones causadas por amebas de vida libre mayormente permanece indeterminado por la imposibilidad de identificar estos agentes en las pruebas habituales, por la ausencia de sospecha clínica y laboratorios de referencia donde se realicen las pruebas específicas para la identificación de estos agentes.(11, 24, 25) Nuestra institución, el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” (IMTAvH) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia es un centro de referencia nacional para enfermedades infecciosas, alberga al IMTAvH que es uno de los centros especializados en el diagnóstico y manejo de infecciones por amebas de vida libre y cuenta con un laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes donde se realizan este tipo de pruebas y ha venido identificando la presencia de estos patógenos en casos de meningoencefalitis con evolución tórpida. Esto ha permitido un tratamiento empírico temprano y disminuir la subsecuente mortalidad asociada.(20, 26, 27) Por este motivo, se planea conducir un estudio transversal con la finalidad de determinar la frecuencia y características clínicas y epidemiológicas de las infecciones del SNC por amebas de vida libre, en pacientes atendidos en los servicios de hospitalización de Medicina, Emergencia y Enfermedades Infecciosas y Tropicales del Hospital Cayetano Heredia (HCH) entre enero del 2019 y febrero del 2020.

Justificación:

Durante el verano del año pasado se presentó el primer caso de MAP por *N. fowleri* en nuestro país,(21) así como alrededor de una decena de casos de meningitis subaguda ocasionadas por amebas de vida libre (comunicación personal)(27), la cual no es detectable en las pruebas de rutina de líquido cefalorraquídeo (LCR), permitiendo la recuperación completa de estos pacientes. Un diagnóstico y tratamiento tempranos permitirían disminuir la alta mortalidad asociada a esta infección. Sin embargo, no existen estudios que hayan investigado la frecuencia de infecciones por amebas de vida libre en nuestra región, la cual reúne las características ambientales necesarias para su proliferación. Conocer la presencia de esta entidad, nos permitiría poder determinar las características que nos permitan diferenciarlas de los agentes etiológicos más frecuentes y mejorar el tratamiento en estos pacientes, al iniciar una terapia empírica temprana.

Objetivos:

Conocer la incidencia de meningitis por amebas de vida libre, en pacientes atendidos en los servicios de medicina del Hospital Cayetano Heredia (HCH).

Objetivos secundarios:

- Describir las características epidemiológicas de los pacientes atendidos con diagnóstico de meningitis por amebas de vida libre en los servicios de medicina del HCH.
- Describir las características clínicas de los pacientes atendidos con diagnóstico de meningitis por amebas de vida libre en los servicios de medicina del HCH.
- Evaluar los aspectos epidemiológicos y clínicos que puedan ayudar a diferenciar la infección por amebas de vida libre en relación a otras causas de meningoencefalitis tempranamente y que permitan el inicio de terapia empírica temprana.

Material y métodos

El presente es un estudio de cohorte prospectiva, que se basará en una vigilancia activa y diaria en los servicios de hospitalización de medicina, infectología y emergencia del HCH, donde se atienden a pacientes mayores de 15 años de edad.

Población de estudio: Inicialmente se identificará a todos los pacientes mayores de 15 años con sospecha de meningitis admitidos entre enero del 2019 y febrero del 2020 y que cumplan los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes mayores de 15 años, con síntomas neurológicos como cefalea, cambio en el nivel de conciencia y comportamiento, fiebre, convulsiones, coordinación alterada o disfasia.
2. Diagnóstico clínico de infección aguda, subaguda y crónica del SNC: meningitis, encefalitis y/o meningoencefalitis.
3. Consentimiento informado firmado otorgado por uno de los padres y/o tutor legal.

4. Muestra de LCR de por lo menos 05 mililitros obtenida por una punción lumbar por el médico tratante como parte de su manejo habitual.

Criterios de Exclusión:

1. Encefalopatía atribuible a eventos metabólicos, tóxicos o hidroelectrolíticos.
2. Infección del SNC secundaria a traumatismos craneoencefálicos o procedimientos neuroquirúrgicos.

Definiciones:

El **diagnóstico clínico de meningoencefalitis** se definirá como pacientes con alteración del nivel de conciencia, disfunción cognitiva, cambios conductuales, anormalidades neurológicas focales o crisis epilépticas, en presencia de hallazgos de laboratorio que sugieran irritación meníngea (recuento leucocitario > 05 cel/mm³) con o sin rigidez de nuca, signos meníngeos o disfunción encefálica. (28)

Factores de riesgo para infecciones por amebas de vida libre: actividades en agua dulce como: piscinas, lagos, lagunas, aguas residuales, canales y canales con lodo (durante los meses de verano y/o cuando la temperatura ambiental supera los 30°C), así como historia de irrigación nasal.

Procedimientos:

Los pacientes que atiendan a los servicios de Medicina (Emergencia, Unidad de Cuidados Intensivos y Hospitalización de Medicina e Infectología) que cumpla los criterios de inclusión y ninguno de exclusión recibirán a atención médica rutinaria, incluyendo las pruebas destinadas a la identificación de los patógenos causales comunes. Posteriormente en coordinación con los médicos tratantes, el grupo investigadores contactará a los pacientes para proporcionarles información del estudio y solicitarles su consentimiento o asentimiento informado para su participación y en aquellos que por su estado clínico no puedan darlo o sean menores de edad se contactará a los padres/tutores legales.

Una vez obtenido el consentimiento informado se asignará un código de identificación a cada paciente, se procederá a la recolección de datos demográficos, clínicos y de laboratorio de los pacientes en una ficha elaborada para tal fin (Anexo 1) y se procesara los exámenes propios del estudio: examen en fresco, cultivo y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

Los exámenes dirigidos a la detección de amebas de vida libre incluyen: examen en fresco y cultivo de LCR, los cuales se realizarán inmediatamente en el Laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes del IMTA vH. Para la realización de estos estudios se requerirá un volumen de LCR de 5 mL, colectado idealmente al momento del ingreso y mantenidos a temperatura ambiente o al momento de su identificación e inclusión al estudio.

El **examen en fresco** se llevará a cabo en una muestra de LCR sin centrifugar, colocando una alícuota directamente en la lámina portaobjeto y revisado directamente al microscopio. El resultado se reportará como presencia o ausencia de trofozoitos de amebas de vida libre. En caso de ser positivo para amebas de vida libre adicionalmente se especificará la carga parasitaria (cantidad de trofozoitos en 100 campos).

El **aislamiento de amebas de vida libre por cultivo** se realizará una vez por semana, para lo cual se preservará la muestra a temperatura ambiente y utilizando un volumen de 3 mL. Se utilizará los siguientes medios de cultivo:

- a) Medio de cultivo en Agar con soluciones no nutritivas con *E. coli* ATCC 25922.
- b) Medio axénico.

Los cultivos serán revisados bajo el microscopio semanalmente a temperatura ambiental y a 30°C por un periodo de 50 a 60 días, para evaluar crecimiento. Al confirmarse el aislamiento se realizará la identificación por morfología y tamaño de trofozoitos y quistes, basándose en el atlas de amebas de vida libre “A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae”.

Al final del periodo de estudio se realizará la identificación de género y especie por métodos de PCR convencional y tiempo real (Detallado en Anexo 2) tanto de la muestra de la placa de agar y directamente de una muestra centrifugada de LCR (0.5 ml) preservada para tal fin, de todas las muestras positivas. Adicionalmente se preservará el volumen de 1 ml LCR restante para pruebas adicionales y futuros estudios en refrigeración a -70 °C en el criobanco del IMTAvH.

Los resultados del examen en fresco serán entregados al médico tratante dentro de las 24 horas de proporcionada la muestra y una copia será entregada al paciente o al padre/tutor legal, para que pueda ser utilizada en el manejo del paciente. El resultado de cultivo será entregado de la misma forma 2 meses después.

Análisis de Datos:

La información obtenida se registrará en una base de datos del programa Excel 2010 elaborada para tal fin. Las variables discretas y nominales se describirán frecuencias y porcentajes; mientras las variables continuas se reportaran medias con sus respectivas desviaciones estándar o medianas con sus rangos intercuantiles, como medidas de tendencia central.

La presencia de asociación estadística se determinará utilizando la prueba de Chi cuadrado de Pearson con la corrección de Yates cuando sea necesario para las variables categóricas. Para las variables continuas se utilizará la prueba t de Student para las variables continuas que tengan distribución normal y pruebas no paramétricas como la suma de rangos de Wilcoxon para aquellas que no tengan distribución normal. Se considerará significancia estadística para un $p \leq 0.05$. Para el análisis se utilizará el programa estadístico STATA versión 13.

Consideraciones Éticas:

El protocolo del estudio y consentimiento y asentimientos informados enviarán para revisión ética y aprobación por los comités de ética en investigación del Hospital Nacional Cayetano Heredia y la Universidad Peruana Cayetano Heredia en concordancia con los principios delineados en la Declaración de Helsinki, 2000 y los lineamientos para las buenas prácticas clínicas del Comité Internacional de Armonización. Los pacientes serán enrolados previa firma del consentimiento informado, en caso de no estar en condiciones clínicas (con encefalopatía) o ser menor de 18 años, los padres/tutores legales serán los encargados de dar el consentimiento informado. Así mismo los participantes menores de 18 años aptos clínicamente (sin encefalopatía) deberán dar el asentimiento informado en adición al consentimiento firmado por los padres/tutores.

Aquellos pacientes con encefalopatía y que tengan resultados positivos para AVL en el examen directo, se realizara un re-consentimiento/re-asentimiento cuando el paciente esté en clínicamente apto y en condiciones de darlo con el fin de llevar a cabo el seguimiento clínico (condición final del paciente) y laboratorial de LCR (según indicaciones del médico tratante) para determinar un adecuado manejo futuro.

Los pacientes tendrán opción a retirarse en cualquier momento del estudio, sin que ello afecte su atención médica. Las fichas de recolección de datos, consentimientos y asentimientos informados, así como las bases de datos se archivarán en las oficinas del IMTAvH bajo llave por un periodo de 5 años.

Cronograma

Año	2018												2019	
Mes	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May
Aprobación ética*	x	x												
Inicio del estudio		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Reclutamiento de participantes, colección de muestras y transporte		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Procesamiento de muestras		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Manejo de base de datos		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Análisis de datos								x					x	x
Informe final/Publicaciones								x					x	x

*Aprobación ética por el comité de ética del Hospital Cayetano Heredia y el comité institucional de ética para humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

Referencias

1. Marciano-Cabral F. Biology of Naegleria spp. Microbiol Rev. 1988;52(1):114-33.
2. Maclean RC, Richardson DJ, LePardo R, Marciano-Cabral F. The identification of Naegleria fowleri from water and soil samples by nested PCR. Parasitol Res. 2004;93(3):211-7.
3. Laseke I, Korte J, Lamendella R, Kaneshiro ES, Marciano-Cabral F, Oerther DB. Identification of Naegleria fowleri in warm ground water aquifers. J Environ Qual. 2010;39(1):147-53.
4. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;50(1):1-26.
5. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by Naegleria fowleri: an old enemy presenting new challenges. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(8):e3017.
6. Baral R, Vaidya B. Fatal case of amoebic encephalitis masquerading as herpes. Oxford medical case reports. 2018;2018(5):omy010.
7. Granerod J, Cunningham R, Zuckerman M, Mutton K, Davies NW, Walsh AL, et al. Causality in acute encephalitis: defining aetiologies. Epidemiol Infect. 2010;138(6):783-800.
8. Granerod J, Crowcroft NS. The epidemiology of acute encephalitis. Neuropsychol Rehabil. 2007;17(4-5):406-28.
9. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. Clin Infect Dis. 2006;43(12):1565-77.
10. Monticelli J, Geremia N, D'Agaro P, Petix V, Luzzati R. Aseptic central nervous system infections in adults: what predictor for unknown etiological diagnosis? Neurological Sciences. 2018;39(5):863-70.
11. 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(4):e68-75.
12. Zahid MF, Saad Shaukat MH, Ahmed B, Beg MA, Kadir MM, Mahmood SF. Comparison of the clinical presentations of Naegleria fowleri primary amoebic meningoencephalitis with pneumococcal meningitis: a case-control study. Infection. 2016;44(4):505-11.
13. Delafont V, Rodier MH, Maisonneuve E, Cateau E. Vermamoeba vermiformis: a Free-Living Amoeba of Interest. Microbial ecology. 2018.
14. Takei K, Toyoshima M, Nakamura M, Sato M, Shimizu H, Inoue C, et al. An Acute Case of Granulomatous Amoebic Encephalitis-Balamuthia mandrillaris Infection. Internal medicine (Tokyo, Japan). 2018;57(9):1313-6.
15. 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 reports. 2016;3(3):e005042.
16. Seas C, Bravo F. Free-living amebas [Review]. Wolters Kluwer Health; 2013 [February 4, 2013];
17. Seas RC, Bravo PF. [Amoebic granulomatous encephalitis due to Balamuthia mandrillaris: fatal disease increasingly recognized in Latin America]. Rev Chilena Infectol. 2006;23(3):197-9.
18. Bravo FG, Alvarez PJ, Gotuzzo E. Balamuthia mandrillaris infection of the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine. Curr Opin Infect Dis. 2011;24(2):112-7.
19. Gotuzzo E, Martinez DY, Bravo F, . Balamuthia mandrillaris, The Peruvian experience. Lima, Peru.
20. Martinez DY, Carreazo Y, Bravo-Cossio F, Cabello AM. Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis using a novel therapeutic regimen including Miltefosine and Voriconazole. XVII Free-living amoeba meeting; Djerba-Zarzis, Tunisia2017.
21. Martinez DY, Seas C, Bravo F, Legua P, Ramos C, Cabello AM, et al. Successful treatment of Balamuthia mandrillaris amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. Clin Infect Dis. 2010;51(2):e7-11.

22. Cabello-Vilchez AM, Rodriguez-Zaragoza S, Pinero J, Valladares B, Lorenzo-Morales J. Balamuthia mandrillaris in South America: an emerging potential hidden pathogen in Peru. *Exp Parasitol*. 2014;145 Suppl:S10-9.
23. Cabello-Vilchez AM, Reyes-Batlle M, Montalban-Sandoval E, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Elias-Letts R, et al. The isolation of Balamuthia mandrillaris from environmental sources from Peru. *Parasitol Res*. 2014;113(7):2509-13.
24. Król-Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2017;24(2):254-60.
25. Cope JR, Ali IK. Primary Amebic Meningoencephalitis: What Have We Learned in the Last 5 Years? *Curr Infect Dis Rep*. 2016;18(10):31.
26. Cabello AM, Silva-Tica E, Guillen D, Gotuzzo E, Martinez DY. Acute meningoencephalitis due to a free-living protozoa (amoeba-ciliate) *N. G.*, *N. Sp.*, and *Streptococcus pneumoniae*. XVII Free-living amoeba meeting; Djerba-Zarzis, Tunisia2017.
27. Martínez DY, Guillen D, Silva-Tica E, Zapata-Yarleque E, Espinoza I, Alvarez A, et al. Sub-acute meningoencephalitis due to free-living amoeba [*Insertae Sedis*]. XVII Free/living amoeba meeting; Djerba/Zarzis, Tunisia2017.
28. Espinoza IO, Ochoa TJ, Mosquito S, Barletta F, Hernandez R, Medina Mdel P, et al. [Enteroviral central nervous system infections in children treated at a hospital in Lima, Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(4):602-9.
29. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res*. 2004;92(5):405-13.
30. Lares-Jiménez L, Lares-Villa F. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 2009;5:159-65.
31. Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevich M, Anderson JW, Feighner SD, et al. Phylogenetic relationships among eight Eimeria species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol*. 1997;83(2):262-71.
32. Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*. 1988;71(2):491-9.
33. Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. Genotyping of Balamuthia mandrillaris based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(1):65-9.

ANEXO 1.

MENINGITIS POR AMEBAS DE VIDA LIBRE

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

INICIALES (Apellidos y Nombres):	N° HISTORIA CLINICA:	FECHA DE INGRESO:
SERVICIO: EMERGENCIA () TROPICALES() MEDICINA()		CÓDIGO:

DATOS EPIDEMIOLOGICOS Y ANTECEDENTES:

FECHA DE NACIMIENTO (DD/MM/AAAA)	LUGAR DE NACIMIENTO:
LUGAR DE PROCEDENCIA:	OCUPACION:
FUENTE DE AGUA, CONSUMO: POTABLE () POZO () OTRO:	
VIAJES EN EL ULTIMO AÑO: Si () No (), Especifique (Lugar y tiempo de permanencia):	
CONTACTO CON FUENTES DE AGUA : Si () No (), Especifique:	
ANTECEDENTES PATOLOGICOS: Si () No (), Especifique:	
DIABETES () FALLA RENAL () HTLV1 ()	CANCER (), Especifique: *
VIH (), CD4:_____; CV:_____ TARGA:	ENF. TEJIDO CONECTIVO ()
USO DE DROGAS INMUNOSUPRESORAS (), Especifique (nombre, dosis y tiempo):	
*	

CUADRO CLÍNICO

TIEMPO DE ENFERMEDAD (DIAS):		
SIGNOS Y SINTOMAS:		
CEFALEA ()	NAUSEAS ()	FOTOFOBIA ()
FIEBRE ()	VOMITOS ()	CONVULSION ()
ALTERACION DEL ESTADO MENTAL ()	GLASGOW:	
ALTERACIONES EN EL COMPORTAMIENTO ()	ALUCINACIONES ()	
SIGNOS MENINGEOS:	RIGIDEZ DE NUCA ()	KERNIG () BRUDZINSKY ()
COMPROMISO DE PARES CRANEALES (), Especifique:		
DEFICITS NEUROLOGICOS FOCALES: (), Especifique:		
CONTROL DE ESFÍNTERES ()	TRANST. MEMORIA ()	AGNOSIA ()
TRANST. COORDINACIÓN ()	DISMETRIA ()	ATAXIA ()
BABINSKY ()	HOFFMAN ()	NISTAGMUS ()
PALMOMENTONIANO ()	CLONUS ()	SUCCION ()
FONDO DE OJO:	PAPILEDEMA ()	

EXAMENES AUXILIARES:

HEMOGRAMA	LEUCOCITOS:		NEUTROFILOS:				
PUNCIÓN LUMBAR	/	/	/	/	/	/	/
PRES. APERTURA:							
COLOR:							
ASPECTO:							
LEUCOCITOS:							
% PMN							
% LMN							
HEMATIES							
PROTEINAS:							
GLUCOSA							
GLUCOSA SERICA:							
ADA							
GRAM							
CULTIVO GERM COM							
LATEX CRIPTO							
CULTIVO HONGOS							
BK DIRECTO							
CULTIVO BK							
GEN XPRT							
ENTHERPEX							
TROFOZOITOS							
CARGA PARASIT							

IMÁGENES	FECHA	CONTRASTE (SI/NO)	HALLAZGOS
TOMOGRFÍA			
RESONANCIA			

TRATAMIENTO			
CONDICIÓN FINAL:	VIVO ()	SECUELA ()	ESPECIFIQUE:
	MUERTO ()		FECHA DE FALLECIMIENTO:

ANEXO 2.

Extracción de ADN de placa de agar:

Se cosecharan las amebas de las placas Petri y se transferirá de las placas a viales de centrifugación para sedimentar las células a 1000 g por 10min o a 5000rpm por 3min. Los sedimentos obtenidos serán usados inmediatamente y/o congelados a -48°C hasta su uso. Se añadirá 500µl de amortiguador de lisis (NaCl, EDTA, TRIS-HCl, Tritón 100-X). Se incubará la muestra en baño maría por 10min a 95°C e inmediatamente se centrifugó a 16000rpm por 10min. Se transferirá 200µl del extracto de la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5ml con 400µl de etanol al 95%. Se agitará brevemente en el vórtex para luego centrifugar a 16000rpm por 5min. Después se decantará el etanol y se dejará secar el precipitado. Posteriormente se disolvió el precipitado en buffer TE y las muestras quedaron listas para su amplificación.

Extracción de ADN del LCR:

Se extraerá el ADN de las cepas directamente del LCR empleando un kit de extracción Quiagen.

Condiciones de PCR convencional y tiempo real:

Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR/secuenciación)

1 set de primer:

Cebadores Universales de Amebas de Vida Libre amplifican el 18S ADNr:

FLA-F: 5´ - CGC GGT AAT TCC AGC TCC AAT AGC - 3´

FLA-R: 3´ - CAG GTT AAG GTC TCG TTC GTT AAC - 5´

Las reacciones de amplificación para el PCR se realizaron en el termociclador con un volumen final de 30µL, 20 pmol para cada cebador, aproximadamente 40-50ng de ADN de *Acanthamoeba* fue utilizado y 1.25 unidades de Taq polimerasa.

Master mix

H2O	21.25	µL
MgCl2 (25mM)	1.5	µL
dntps	4	µL
Primer FLAf (20pm)	1	µL
Primer FLAr (20pm)	1	µL
taq	1.25	µL
ADN Muestra (40ng)	1	µL

40 Ciclos de amplificación del PCR:

2 minutos	94°C
35 ciclos de 30s a	94°C
30s a	42°C
15s a	72°C
Ciclo final de 5 minutos a	72°C

Control positivo será ADN de *A. polyphaga* y otras amebas de vida libre.(29)

2 set de primer:

Cebadores Universales de Eukariotas amplifican el 18S ADNr:

La amplificación del gen SSU rRNA gene será por PCR, empleando cebador universal para células eucarióticas:

(forward ERIB1 5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA G-3' y
(reverse ERIB10 5'-CTTCCGCTGGTTCACCTACGG-3').(30, 31)

Master mix

H2O	21.25	μL/ 13.75 μL
MgCl2 (25mM)	1.5	μL
dntps	4	μL
PCR Buffer	2.5	μl (10 ×)
Primer ERIB1 (5pm)	1	μL
Primer ERIB10 (5pm)	1	μL
taq	0.25	μL
ADN Muestra	(40ng) 1	μL

Ciclos de amplificación del PCR:

5 minutos	95°C (pre calentamiento)
30 ciclos de	
1 min a	95°C
1.5 min	44°C
1.5 min	72°C
Ciclo final de 10 minutos a	72°C

3 set de primer:**La secuencias de los primer:**

Euka A 5' CCG AAT TCG TCG ACA ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT 3'

Euka B 5' CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC 3'(32)

Master mix

H2O	38.75	μL
MgCl2 (25mM)	5	μL
dntps	4	μL
Primer F Euka A (100 ng)	1	μL
Primer R Euka B (100 ng)	1	μL
taq	0.25	μL
ADN Muestra	1	μL

Ciclos de amplificación del PCR

5 minutos	95°C
30 ciclos de:	95 °C por 45 s
45 s	65°C
3 minutos	72°C
7 minutos	72°C

Secuencias de pares de Cebadores para la identificación de especies

Nombre Cebador	Secuencia	Identificación de especie
NFITSFW NFITSRV	TGAAAACCTTTTTCCATTTACA AATAAAAGATTGACCATTTGAAA	<i>Naegleria fowleri</i>
ITSFW ITSRV	AACCTGCGTAGGGATCATT TTTCCTCCCCTTATTAATAT	<i>Naegleria spp.</i>
JITSFW JITSRV	GTCTTCGTAGGTGAACCTGC CCGCTTACTGATATGCTTAA	Vahlkampfiidae

Los cebadores JITSFW / JITSRV, ayudan a establecer el género *Vahlkampfia sp* de *Naegleria*.

Para el PCR(33), Taq polimerasa y buffer de reacción, la perla es reconstituida a un volumen final de 25µl, la concentración de cada nucleótido es de 200µM en Tris-HCl 10mM (pH 9.0 a temperatura ambiente), KCl 50mM y MgCl₂ 1.5mM. A cada perla se agregara: 22µl de agua bi-destilada, 1µl del cebador NFFW 1µl, 1µl del cebador NFRV y 1µl de muestra para 30 ciclos:

- Pre calentamiento a 94°C por 5min
- Desnaturalización a 94°C por 1min
- Alineamiento a 52°C por 1.5min
- Extensión a 72°C por 2min
- Extensión final 72°C por 5min

Para la corrida electroforética de los productos de PCR, se utilizará agarosa al 2%