

Queratitis por *Acanthamoeba*

J. Álvarez de Toledo, O. Buchacra, E. Giagante
Centro de Oftalmología Barraquer. Barcelona

Correspondencia:

J. Álvarez de Toledo

E-mail: alvarezt@co-barraquer.es

Introducción

La *Acanthamoeba* es un género de protozoo de vida libre del subfilo Sarcodina¹. Al igual que otros protozoos, es unicelular y puede existir en dos formas: trofozoito activo, y quiste inactivo. La forma de trofozoito (16-47 μm de long.) es móvil, tiene capacidad proliferativa y se alimenta de bacterias, hongos y otros microorganismos unicelulares. En condiciones adversas, los trofozoitos se enquistan, formando una doble pared que contiene celulosa. La forma de quiste (10-25 μm de diámetro) es mucho más resistente a los ambientes extremos, así como al cloro y a otros agentes antimicrobianos (Figura 1).

Reseña histórica

Las amebas de vida libre fueron descritas por primera vez por Rösel Von Rosenhof en 1752^{2,3}. Dujardin⁴ encontró numerosas amebas limax (el término "limax" se usó para pequeñas amebas con movimiento lánguido) en muestras de agua recogidas del río Sena en Francia. En un informe interesante publicado por Franchini⁵, pequeñas amebas fueron recolectadas de la superficie de plantas de lechuga y fueron llamadas "amoeba lettuce"^{6,7}. En 1930 Castelanii⁸ demostró que amebas limax que contaminaban un plato de agar, consumían bacterias y levaduras que crecían en el medio. Esta observación condujo al desarrollo de métodos para lograr cultivar amebas de vida libre en el laboratorio. En base a la morfología, las amebas limax fueron reclasificadas desde el género *Hartmanella* al nuevo género *Acanthamoeba*^{9,10}.

La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección corneal severa, progresiva, y que puede llevar a la ceguera. El primer caso fue descrito en 1973 en un hombre de 59 años que se dedicaba a la cría de ganado en el sur de Texas. El paciente había sufrido un traumatismo ocular y había estado expuesto a agua contaminada¹¹. Entre 1973 y 1981 solamente 5 casos adicionales fueron descritos. El número de casos aumentó gradualmente entre 1981 y 1984, con un aumento de la incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* en estadios avanzados durante toda la década de los 80^{12,13}. Parecía no sólo que se diagnosticaba mejor, sino también que la incidencia de la enfermedad aumentaba rápidamente. Desde entonces, ésta parece haberse estabilizado.

Epidemiología

Se trata de microorganismos ubicuos, que han aparecido en todo tipo de medio acuoso líquido, por ejemplo el agua de grifo, el agua embotella-

da, las piscinas, los baños calientes, las soluciones de lentes de contacto, así como en el suelo y en el aire¹⁴. Su mayor prevalencia parece ocurrir en las épocas de más calor. La *Acanthamoeba* se puede aislar en la boca y la faringe de algunos niños y adultos asintomáticos^{15,16}. Así, aunque es probable que estemos constantemente expuestos a estos microorganismos, rara vez se producen infecciones clínicas.

La queratitis es la principal infección de la *Acanthamoeba* en humanos. Han sido descritas varias infecciones no oculares causadas por amebas de vida libre; muchas de ellas han sido casos de meningoencefalitis granulomatosas¹⁷⁻¹⁹.

Se desconocen las razones por las que estas infecciones se producen. Es probable que se precise una rotura en la superficie epitelial para que este microorganismo penetre, pero también podrían estar involucrados una particular susceptibilidad individual, defectos inmunológicos de la mucosa u otros defectos de los mecanismos de defensa del huésped y/o una exposición repetida, o la inoculación en un punto inmuno-privilegiado como es la córnea. Puede ser necesaria una infección concomitante con bacterias, hongos o virus para proporcionarle alimento a la *Acanthamoeba*^{20,21}.

Como sucede con los hongos, la *Acanthamoeba* puede ser relativamente no inmunogénica: puede aparecer en la córnea sin infiltrados celulares circundantes. Estas amebas liberan enzimas, entre ellas fosfolipasas, lisozimas y celulosa^{22,23}. Algunas especies de *Acanthamoeba* son patogénicas y otras no; se han realizado diversos estudios sobre este tema entre los que se citan:

1. Características y diferenciación entre clases de *Acanthamoeba* patogénicas y no patogénicas a través de sus proteínas y perfiles antigénicos²⁴.
2. Secreción de una proteína citolítica por la *Acanthamoeba*, inducida por una proteína de la superficie ocular, que sería la causante de la enfermedad^{25,26}.
3. Diferencias morfológicas y patogénicas entre las cepas patogénicas y las que no lo son²⁷.
4. Diferencias en las propiedades fisiológicas entre las clases relevantes y no relevantes de *Acanthamoeba*, aisladas de lentes de contacto de pacientes con queratitis²⁸.

La queratitis por *Acanthamoeba* es más frecuente en adultos jóvenes en buen estado de salud e inmunocompetentes, aunque actualmente también se describen casos en pacientes inmunodeprimidos como VIH positivos^{29,30}. Se han hallado amebas de vida libre que pueden ser patógenas oportunistas y no oportunistas tanto en animales como en humanos¹⁹.

La queratitis por *Acanthamoeba* generalmente es unilateral, pero se han descrito casos bilaterales³¹. Casi todos los casos recientes (71 al 85%) se han relacionado con la utilización de lentes de contacto³²⁻³⁵, por lo general blandas, y con el uso de soluciones contaminadas, entre ellas el agua de grifo, agua de pozo, soluciones salinas de fabricación casera y saliva^{36,37}.

Factores de riesgo

Existen numerosos e importantes factores de riesgo asociados con la queratitis por *Acanthamoeba*, y la mayoría de los pacientes poseen al menos uno de estos factores identificados: trauma corneal, agua contaminada y/o utilización de lentes de contacto².

Ningún tipo de lentes de contacto, ha sido excluido de la asociación con queratitis por *Acanthamoeba* y tanto los quistes como los trofozoitos, pueden adherirse a ellas³⁸. Los pacientes con lentes de contacto de uso diario representan aproximadamente el 75% de los pacientes; el 14% son usuarios de lentes de contacto de uso prolongado; 6% portan lentes de contacto rígidas, y 4% rígidas permeables al gas³⁴. En otro estudio, Stehr-Green, *et al.*³⁵ describieron que muchos pacientes (95%) poseían al menos un factor de riesgo para queratitis por *Acanthamoeba*; entre los que utilizaban lentes de contacto (85%), muchos llevaban de uso diario (56%) y algunos, las de uso prolongado (19%). Pocos pacientes tenían historia de trauma ocular (26%) antes del desarrollo de queratitis por *Acanthamoeba* y un 25% tenía historia de exposición a agua contaminada. También se han descrito casos de queratitis por *Acanthamoeba* como complicación de la ortoqueratología^{39,40}.

Los trofozoitos de la *Acanthamoeba*, no sólo se adhieren a las lentes de contacto que están en uso, sino también a nuevas y de cualquier tipo⁴¹.

Las lentes de contacto sirven como vehículo para la *Acanthamoeba*. Su aislamiento en botellas de agua comerciales como así también en agua de grifo explican la alta incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* en los países que usan agua destilada no estéril de fabricación casera para almacenar y limpiar las lentes de contacto. Cualquier lente de contacto es un vehículo potencial de *Acanthamoeba* hacia la superficie ocular, después de haber estado expuesta a fuentes de fluido contaminadas, como saliva y solución salina sin conservantes³⁴. En muchos casos, se han observado bacterias y hongos en los envases de las lentillas, y estos microorganismos pueden servir como fuente de alimento para la *Acanthamoeba*⁴². Así mismo, bacterias y hongos de la flora ocular externa normal, como *Staphylococcus epidermidis* y *Corynebacterium*, favorecen el crecimiento de la *Acanthamoeba*⁴³.

Una vez en la córnea, la *Acanthamoeba* puede crecer en las células epiteliales y queratocitos⁴⁴. Allí induce la activación de colagenasas, muraminidasas y otras enzimas proteolíticas que pueden desempeñar un papel importante en la invasión y destrucción de la córnea (Figuras 2 y 3)⁴⁵.

Diversos países, entre ellos Australia⁴⁶⁻⁴⁸, han realizado estudios en relación a la queratitis por *Acanthamoeba* y su incidencia, factores de riesgo, intervalo de diagnóstico o la eficacia y resultado del tratamiento habitual en cada uno de ellos.

Manifestaciones clínicas

En la Tabla 1 se indican las características clínicas de la queratitis por *Acanthamoeba*^{1,49}. Entre los síntomas se pueden encontrar dolor, fotofobia, irritación, sensación de cuerpo extraño, lagrimeo y disminución de la



Figura 1. Quiste de *Acanthamoeba* (flechas)

Figura 2. Perforación corneal tras queratitis por *Acanthamoeba*

Figura 3. Perforación corneal tras queratitis por *Acanthamoeba*

Figura 4. Velamiento epitelial

Figura 5. Punteado epitelial lineal

Figura 6. Queratitis intersticial y anillo corneal inmunológico

Figura 7. El mismo paciente de la foto anterior con luz de Cobalto

visión. El dolor suele ser intenso y no guarda relación con los signos de inflamación, aunque presentaciones atípicas pueden cursar con mínimo e incluso, sin dolor^{50,51}. En las primeras etapas de la infección, los signos se limitan algunas veces sólo al epitelio¹. Pueden aparecer defectos epiteliales, pseudodendritas, tinción punteada, velamiento epitelial (Figura 4), granularidad, líneas epiteliales elevadas (Figura 5) y microquistes.

En la afectación precoz del estroma, el edema es más notable que la infiltración. El patrón de infiltración del estroma varía, pero suele ser más denso en la parte media de la periferia (Figura 6), formando a veces un anillo completo (Figura 7). Por lo general existe un infiltrado central, pero

Característica	Frecuencia	Etapas
Dolor	++++	E, L*
Infiltrado anular	+++	L
Infiltrado central del estroma	+++	L
Halo epitelial, tinción punteada, pseudodendritas, líneas elevadas	++	E, L
Rotura epitelial recidivante	++	E, L
Disminución de la sensibilidad corneal	++	E, L
Queratoneuritis radial	+	E
Escleritis	+	L
Adenopatía	+	
Hipopión	+	L
Aumento de la presión intraocular	+	L

*E, precoz; L, tardía

Tabla 1. Características clínicas de la queratitis por *Acanthamoeba*

la córnea que se encuentra en el interior del anillo puede ser relativamente transparente. También se puede observar un doble anillo o sólo un infiltrado central. Aparecen en ocasiones infiltrados satélites fuera del anillo que parecen granulares. El epitelio suprayacente a los infiltrados puede estar intacto, pero es frecuente la ruptura epitelial recurrente.

Un escaso número de casos presenta queratoneuritis radial, pero aunque no es un signo patognomónico, su aparición es bastante sugestiva debido a que es muy raro que aparezca en otras enfermedades. Sin embargo, se ha publicado un caso con queratoneuritis radial en el que se aisló *Pseudomonas aeruginosa*⁵². Pueden observarse infiltrados esponjosos a lo largo del trayecto de uno o más nervios corneales, infiltrados que afectan algunas veces las porciones centrales o periféricas de los nervios, suelen ser transitorios, y pueden preceder a otras formas de infiltrados del estroma⁵³.

La inflamación neural puede ser responsable del intenso dolor que presentan muchos de estos pacientes y podría explicar también la disminución de la sensibilidad corneal que se observa en otros.

Asociada a la queratitis, puede aparecer una epiescleritis anterior nodular o difusa, por lo general adyacente al limbo, y una escleritis posterior con o sin neuritis óptica¹. Suele observarse reacción en cámara anterior, que a veces es lo suficientemente intensa como para producir hipopion o un aumento de la presión intraocular. Algunos pacientes desarrollan adenopatías. Se han detectado infecciones secundarias causadas por bacterias, principalmente estreptocócicas, pero también de origen fúngico^{54,55} y viral^{56,57}.

Las rupturas epiteliales recurrentes, el anillo de infiltrados y los abscesos, frecuentemente simulan el cuadro clínico producido por el Herpes Simple² (Figuras 8a-8c).

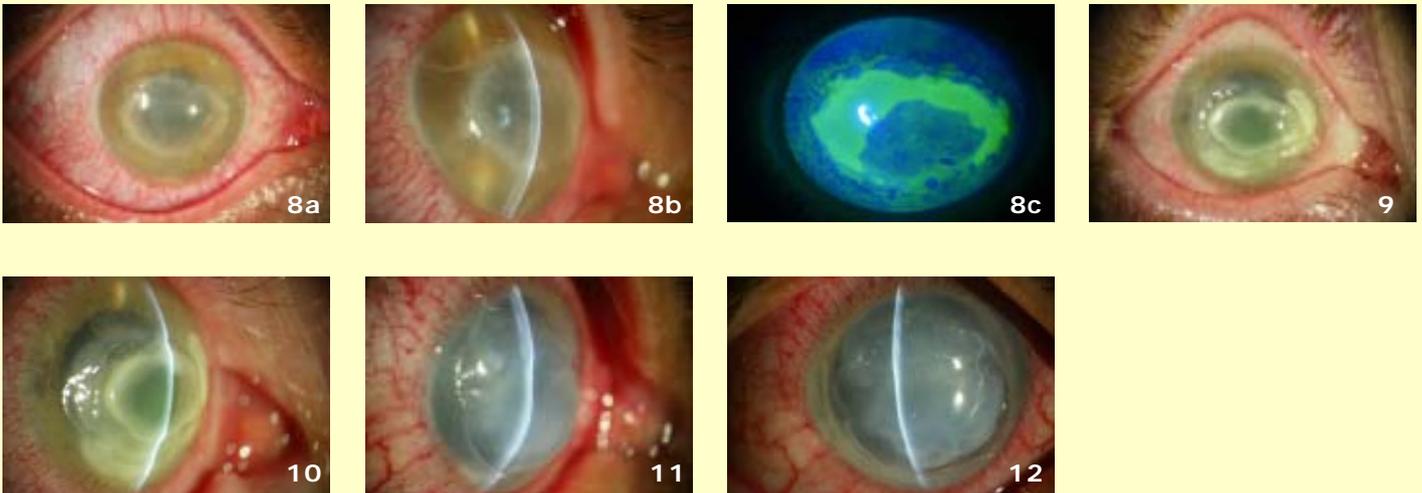


Figura 8a. Anillo inmunológico elíptico prácticamente patognomónico de infección por *Acanthamoeba* en fase avanzada. Marcada inyección ciliar

Figura 8b. Imagen con hendidura. Escaso adelgazamiento corneal, infiltrado de predominio superficial y medio con finos precipitados endoteliales difusos

Figura 8c. Defecto epitelial. Geográfico sobre los bordes de avance del anillo inmunológico. Imagen con fluoresceína

Figura 9. Adelgazamiento y ectasia corneal tras infección por *Acanthamoeba*

Figura 10. Adelgazamiento y ectasia corneal tras infección por *Acanthamoeba*

Figura 11. Queratitis por *Acanthamoeba* tras LASIK: necrosis y melting corneal

Figura 12. Queratitis por *Acanthamoeba* tras LASIK: necrosis y melting corneal

Patogénesis

Como se describió previamente², la *Acanthamoeba* presenta dos estadios en su ciclo vital: el trofozoíto activo y el quiste inactivo o quiescente. El tamaño de los trofozoítos varía entre las especies pero generalmente mide de 10 a 25 μm de longitud y se caracteriza por un núcleo simple y unseudópodo en forma de espina llamado acantapodia. Los trofozoítos se enquistan en condiciones desfavorables. El quiste se caracteriza por una pared de aspecto arrugado y mide aproximadamente de 10 a 15 μm de diámetro.

La patogénesis de la queratitis por *Acanthamoeba* puede seguir dos caminos⁵⁸. El primero está restringido al epitelio, sin compromiso del estroma y tiene buen pronóstico. El segundo camino, culmina cuando el parásito entra en el estroma, produciendo una necrosis extensa, edema, e infiltración por leucocitos polimorfonucleares (Figuras 9 y 10)⁵⁹.

Adherencia e invasión

El primer paso en el comienzo de la infección amebiana es la unión a la superficie epitelial². Esto conlleva al adelgazamiento y necrosis epitelial. Eventualmente, el parásito penetra en el estroma y desarrolla necrosis, edema, disrupción de la lamela estromal y una intensa respuesta inflamatoria polimorfonuclear⁶⁰.

Los trofozoítos producen efectos citopáticos en diversos cultivos de células de mamíferos incluyendo el epitelio corneal humano⁶¹⁻⁶³. Sin embargo, tanto amebas patogénicas como no patogénicas producen efectos citopáticos en cultivos celulares^{63,64}. La posesión de una maquinaria citolítica no necesariamente conlleva patogenicidad.

El efecto citopático podría deberse a: 1. fagocitosis, 2. exocitosis espontánea ó, 3. exocitosis iniciada en la membrana. Una proteína citolítica formadora de poros, podría estar involucrada en la muerte de las células diana. La muerte de células diana inducida por *Entamoeba histolítica*, *Naegleria fowleri*, linfocitos T citolíticos y complemento, está producida por disrupción de la membrana por una proteína formadora de poros que se inserta en la membrana de estas células^{65,66}. En la infección por *Acanthamoeba* no está claro si las células diana deben estar dañadas antes de la fagocitosis, pero las amebas raramente ingieren las células diana en el primer contacto⁵⁹. Experimentos con la *E. histolítica*, demostraron que las amebas se unen rápida y firmemente a las membranas plasmáticas de las células diana e inducen cambios marcados en cuanto a su permeabilidad a los cationes. Los poros resultantes transforman a las células en altamente permeables al Na^{2+} y al Ca^{2+} ⁶⁷. El mecanismo de adherencia y la citopatogenicidad de la ameba aún están por determinarse.

Una vez en el estroma corneal, la *Acanthamoeba Castellanii* secreta enzimas colagenolíticas que producen severa necrosis, edema, inflamación e infiltrados en forma de anillo (Figuras 11 y 12)⁶⁸. *Acanthamoebas* no patogénicas aisladas del suelo producen enzimas similares pero no producen enfermedad corneal in vivo. El sobrenadante de cultivos de *A. Castellanii* aisladas en muestras oculares, muestran activador del plasminógeno, pero esta actividad no está presente en cultivos celulares de *A. castellanii* no patogénicas aisladas del suelo⁶³. De este modo es posible que la patogénesis de la queratitis por *Acanthamoeba* involucre la activación del plasminógeno que activa la plasmina, y de esta manera permite la penetración del parásito dentro del epitelio corneal.

Cultivos en tejido nervioso de *A. Castellanii* contienen una enzima colagenolítica que digiere las fibras de colágeno y colágeno tipo I purificado in vitro. Cuando las enzimas inhibitorias selectivas son utilizadas, se

ha demostrado que los parásitos producen enzimas colagenasas y otras enzimas proteolíticas. Sin embargo, gran parte de la actividad colagenolítica se atribuye directamente a colagenasas específicas. La inyección intraestromal de un medio estéril condicionado de *Acanthamoeba* en córneas de ratas, produce lesiones que clínica e histológicamente son semejantes a aquéllas encontradas en pacientes diagnosticados de queratitis por *Acanthamoeba*. Por lo tanto, factores solubles derivados del parásito, son capaces de producir lesiones características de la queratitis por *Acanthamoeba* en humanos. Estos hallazgos sugieren además, que la degradación estromal en la queratitis por *Acanthamoeba*, podría estar causada ampliamente por las colagenasas derivadas del parásito⁶⁸.

Respuesta inflamatoria

Escasa información está disponible sobre los mecanismos inmunológicos efectores o sobre los mecanismos inmunopatogénicos en la queratitis por *Acanthamoeba*. Muchos estudios han demostrado que anticuerpos y complemento están involucrados en la lesión por *Acanthamoeba in vitro*⁶⁹⁻⁷². La actividad antiamebiana de los anticuerpos está incrementada por la presencia de macrófagos y neutrófilos^{71,73}.

Investigaciones en especímenes patológicos de humanos y animales revelan que ocurren severas respuestas inflamatorias en la queratitis por *Acanthamoeba*^{60,74}. Los macrófagos predominan en las etapas precoces de las infecciones experimentales⁷⁴. Debido a que es necesaria una respuesta inflamatoria intacta para expresar clínicamente una queratitis por *Acanthamoeba* completa, los animales con severa inmunosupresión crónica^{75,76} no sirven para simular lo que ocurre en la queratitis por *Acanthamoeba* en humanos. Los intentos en producir queratitis por *Acanthamoeba* en ratas y conejos, fracasan en evidenciar que estos huéspedes desarrollen lesiones corneales semejantes a las que se producen en humanos. Modelos previos utilizaban inyecciones de parásitos con o sin bacterias dentro de la córnea en vez de la inducida por lentes de contacto^{62,77}. Las especies de *Acanthamoeba* son aparentemente específicas de cada huésped⁷⁸.

Otros estudios han evaluado la respuesta inmune celular hacia la *A. Castellanii*. En presencia de suero normal, los macrófagos provenientes de ratas no infectadas, produjeron mínima lisis de los trofozoítos in vitro. Suero de ratas inmunizadas con agregado de macrófagos, más extracto acuoso con antígenos de *A. Castellanii* y activado con γ interferón recombinado de rata, produjeron la citolisis de 43% de los parásitos en un ensayo de 6 horas. En contraste, macrófagos extraídos de ratas inmunizadas y activados con suero inmunizado más γ -interferón recombinado lisaron casi el doble de los parásitos, del mismo modo que macrófagos recogidos de ratas no inmunizadas y activadas de manera similar. Los macrófagos de ambas ratas, inmunizadas y no inmunizadas con antígenos de *Acanthamoeba*, responden quimiotácticamente a los antígenos del parásito⁷¹.

Diagnóstico

La presentación clínica de la queratitis por *Acanthamoeba* rara vez es diagnóstica. Sin embargo, algunas de sus características clínicas deben hacer sospecharla, siendo esta sospecha muy importante para poder llegar al diagnóstico precoz (Figuras 13a-13d).

En general una queratitis superficial en un paciente portador de lentes de contacto que no cura en una o dos semanas con los tratamientos habituales deben hacernos poner en guardia ante la posibilidad de infección por

el parásito. Aunque los portadores de lentes de contacto tienen derecho a tener una queratitis por herpes simple, si no hay antecedentes del mismo no debemos pensar primero en herpes sino en *Acanthamoeba*. Este error diagnóstico inicial es el más frecuente entre los oftalmólogos y provoca un retraso en el diagnóstico que conduce a la progresión de la enfermedad a estadios avanzados en los cuales la curación es muy difícil.

En cuanto al diagnóstico de laboratorio las muestras deben inocularse en agar sin nutriente, cubierto previamente con *Escherichia coli* o *Enterobacter aerógenes*, aunque en algunas oportunidades se ha producido crecimiento en agar sangre, agar chocolate, agar Sabouraud o en medio de Löwenstein-Jensen. La mayoría de las tinciones estándares, entre ellas las de Gram, Giemsa o Wright, mostrarán el microorganismo cuando éste se encuentre presente en el frotis, pero suele ser necesaria una búsqueda meticulosa por un observador experimentado. El blanco calco-flúor y el naranja de acridina pueden facilitar la detección.

Estas pruebas no suelen tener éxito, sobre todo si se llevan a cabo al principio del curso de la enfermedad. Puede resultar útil tanto desde el punto de vista diagnóstico como terapéutico la extracción y el examen del epitelio intacto pero anormal, aunque por lo general se requiere una biopsia estromal en la media periferia para llegar al diagnóstico. Si el paciente ha utilizado lentes de contacto, deben cultivarse las lentes y todas las soluciones. El aislamiento del microorganismo es sugestivo y puede bastar para iniciar el tratamiento, siempre que la presentación clínica resulte consistente. La presencia de cultivos polibacterianos en el medio de preservación de las lentillas indica también la posibilidad de que existan amebas aunque no se detecten en el cultivo ya que las bacterias son su alimento.

Un estudio retrospectivo sobre las queratitis por *Acanthamoeba* que se realizó en el Sydney Eye Hospital de Australia, fue publicado en febrero de 2005⁷⁹. Este estudio incluyó a todos los pacientes que presentaron queratitis

por *Acanthamoeba* entre enero de 1997 y diciembre de 2002, resultando 20 pacientes con un seguimiento medio de $24,8 \pm 21,5$ meses, constituyendo el 4,7% de las queratitis infecciosas severas tratadas en dicho Hospital. El tiempo promedio desde la primera consulta hasta llegar al diagnóstico fue de $26,6 \pm 35,1$ días (69% fueron diagnosticados dentro de las 72 horas). Entre los que recibieron un diagnóstico tardío más allá del mes, el 57% habían sido erróneamente diagnosticados de queratitis por Herpes simple. Dieciséis (80%) llevaban lentes de contacto, y 8 (40%) tuvieron factores de riesgo adicionales como mala higiene de las lentillas. Siete (35%) pacientes requirieron queratoplastia penetrante. La agudeza visual mejoró en 18 pacientes (90%) y empeoró en 2 (10%), y el 75% alcanzó 6/12 o mejor en el último examen. Este estudio concluyó que la queratitis por *Acanthamoeba* es una rara infección, y que la asociación más común son las lentillas de contacto, con pobre higiene de las mismas, y constituye el factor de riesgo más importante. Los pacientes con diagnóstico tardío y los no portadores de lentillas presentan un mayor riesgo de presentar recurrencias. Un alto índice de sospecha se mantiene como la estrategia más efectiva para la instauración temprana del tratamiento y la posibilidad de un resultado favorable.

Nakano, *et al.* de Sao Paulo, publicaron el papel de la microscopía confocal en el diagnóstico temprano de la queratitis por *Acanthamoeba*⁸⁰. En este estudio se correlacionaron las imágenes obtenidas con un microscopio confocal en córneas con sospecha clínica de queratitis por *Acanthamoeba*, y otras con el diagnóstico confirmado por análisis citológico e histológico. Ellos concluyeron que la microscopía confocal, una técnica no invasiva, resulta de gran utilidad en el diagnóstico de la queratitis amebiana, especialmente en aquellos casos en que el raspado corneal, el análisis citológico y el cultivo hayan sido negativos. Este procedimiento también elimina la necesidad de una biopsia tisular, que además es una técnica invasiva.

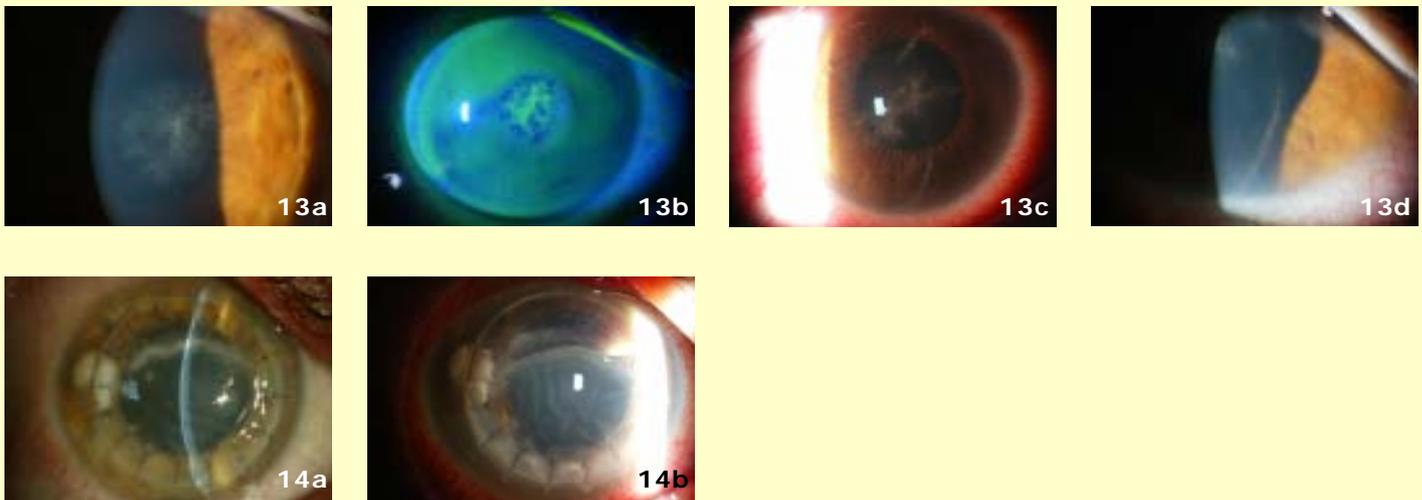


Figura 13a. Infiltrados corneales en forma pseudodendrítica por *Acanthamoeba*

Figura 13b. Infiltrados corneales en forma pseudodendrítica por *Acanthamoeba*. Imagen con fluoresceína

Figura 13c. Infiltrados corneales en forma pseudodendrítica por *Acanthamoeba*. Dos líneas de perineuritis radial en la zona superior e inferior

Figura 13d. Detalle del engrosamiento inflamatorio del axon corneal, que aunque no patognomónico, si es muy sugestivo de *Acanthamoeba*

Figura 14a. Recurrencia de la infestación a partir de un quiste periférico a las 9:30 a los dos meses de la cirugía. Dehiscencia de la cicatriz y velamiento del injerto

Figura 14b. Recurrencia de la infestación a partir de un quiste periférico a las 9:30 a los dos meses de la cirugía. El parásito migró a partir de cornea receptora hacia las 2 horas provocando la lisis del estroma superficial y medio en forma de surco

En la India, la *Acanthamoeba* es uno de los organismos causales de queratitis en pacientes sin historia de uso de lentes de contacto. Sharma^{B1}, propone la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la tipificación ribosomal del ADN, para el diagnóstico temprano y definitivo, lo que conduciría a un mejor pronóstico.

Tratamiento

El tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* ha sido en general decepcionante, debido en parte a que la infección solía estar avanzada al momento del diagnóstico. Sin embargo, los medios actuales de tratamiento no llegan a ser óptimos. Son pocos los medicamentos que destruyen los trofozoítos in vitro y no está claro si alguno destruye los quistes. Las evaluaciones de los medicamentos han sido escasas, debido al número reducido de casos tratados, a las distintas etapas en que se inicia el tratamiento, a los altibajos naturales de la enfermedad y a las diferencias que existen entre las distintas cepas de *Acanthamoeba*. La mejoría es lenta con cualquiera de estos agentes, y a no ser que el tratamiento médico se inicie muy pronto en el curso de la infección, el tratamiento será prolongado. Es probable que se requiera un desenquistamiento o la eliminación de los microorganismos restantes para erradicar la infección.

Se ha propuesto la queratoplastia penetrante precoz para eliminar o disminuir la infección resistente. Aunque este procedimiento puede ser útil, hay muchos casos en los que el microorganismo permanece en el tejido corneal periférico y la infección vuelve a aparecer en el injerto. Hemos visto una recidiva sobre trasplante hasta dos meses después de la cirugía en un caso aparentemente curado (Figuras 14a y 14b). Es frecuente que la infección por *Acanthamoeba* se extienda al estroma aparentemente transparente y no se puedan apreciar sus límites sin una exploración del tejido. Las infecciones recidivantes en el injerto corneal tienden a ser más difíciles de tratar que las primarias.

Por lo general, hay que continuar con el tratamiento médico si el paciente responde positivamente. La queratoplastia penetrante tiene mejor pronóstico tras un tratamiento médico prolongado. En los casos publicados, las recidivas fueron menos frecuentes si se había administrado tratamiento médico durante al menos 4 meses previos a la intervención. No obstante, la queratoplastia penetrante se puede realizar antes si el diagnóstico es precoz y si la extirpación de todo el tejido involucrado se estima posible. Si se produce perforación, puede ser necesario realizar una queratoplastia para conservar el globo ocular.

Dentro de la familia de las diamidinas, la propamidina (Brolene) es la droga con la que se tiene una experiencia más extensa hasta la fecha, y se han conseguido algunas curaciones médicas, fundamentalmente en combinación con colirios de polimixina B-neomicina-gramicidina. La propamidina presenta actividad antibacteriana y antifúngica y se vende sin receta en Inglaterra. La pauta de tratamiento recomendada es la siguiente: se alternan inicialmente propamidina y gotas de polimixina B-neomicina-gramicidina cada 30-60 minutos durante 3 días. El resto de la primera semana, las gotas se administran cada hora durante el día y cada dos horas por la noche. Luego, la administración se va disminuyendo gradualmente a cuatro veces al día. Se puede administrar la pomada de dibromopropamidina por la noche. El tratamiento debe prolongarse al menos 1 año generalmente. La propamidina es tóxica para la superficie epitelial, produciendo con frecuencia inyección conjuntival y quemosis, microquistes epiteliales corneales y queratopatía punctata. Puede desarrollarse resistencia durante el tratamiento.

Los imidazoles como el miconazol, el cotrimazol y el ketoconazol se mostraron eficaces in vitro frente a algunas cepas de *Acanthamoeba*. El miconazol tópico, el cotrimazol tópico al 1-2% y el ketoconazol oral

(200-400 mg/día) han tenido buena respuesta en algunos pacientes, pero en otros no. Tal vez, el más prometedor de los imidazoles sea el cotrimazol, que se ha utilizado con éxito en varios casos junto a la propamidina o tras un tratamiento sin éxito con esta última. En algunos de estos casos, el cotrimazol in vitro fue el más eficaz de los agentes. Algunos pacientes toleraron la pomada dermatológica al 1%, pero a veces fue necesario obtener el polvo de cotrimazol y formular una suspensión al 1-2% en lágrimas artificiales. El miconazol puede resultar eficaz pero a veces es irritante; además, hay que formularlo cada semana, porque en solución es inestable. Aunque el ketoconazol oral puede resultar útil, conlleva un pequeño riesgo de hepatotoxicidad.

Entre las biguanidas poliméricas, se encuentra la polihexametilén-biguanida (PHMB) que es un desinfectante que se usa normalmente en piscinas y ocasionalmente en algunas soluciones para lentes de contacto. Daña las membranas citoplasmáticas e inhibe las enzimas respiratorias esenciales en los organismos susceptibles. Es eficaz contra trofozoítos y quistes. En un estudio in vitro fue más eficaz que la propamidina y los imidazoles frente a 23 aislamientos clínicos. En solución al 0,02% es eficaz en muchos casos de queratitis por *Acanthamoeba*, incluyendo muchos que no responden al tratamiento con propamidina y neomicina. Sin embargo, algunos pacientes no responden aún cuando el aislamiento resulta sensible in vitro. El tratamiento combinado con polihexametilén-biguanida, propamidina y neomicina fue eficaz en los cinco pacientes de un estudio realizado por Varga JH, *et al.*

Los aminoglucósidos neomicina y paromomicina, parecen resultar menos eficaces que los dos grupos anteriores, pero pueden serlo combinados con otros agentes. La neomicina es ligeramente tóxica y puede inducir reacciones de hipersensibilidad. La experiencia clínica con otros agentes como natamicina y ciproxolamina es limitada.

En la queratitis por *Acanthamoeba*, como en otras formas de queratitis infecciosa, la utilización de corticoides es polémica. Los corticoides disminuyen la inflamación y aumentan el bienestar, pero también disminuyen la capacidad del huésped para erradicar la infección. En la queratitis por *Acanthamoeba*, los agentes antimicrobianos disponibles actualmente no pueden destruir los microorganismos de la córnea, sobre todo las formas quísticas, y la respuesta del huésped parece tener especial importancia. Además los corticoides inhiben la salida del quiste del microorganismo a la forma trofozoito, al menos in vitro. Clínicamente, el efecto de los corticoides no está claro, pero los resultados parecen mejorar si se evita su utilización o si ésta es mínima y si sólo se administra concomitantemente con un antiamebiano eficaz.

El debridamiento epitelial puede reducir o eliminar la carga infectante al principio de la enfermedad. Se ha comprobado que el dimetilsulfóxido incrementa in vitro la eficacia del isotonato de propamidina frente al quiste de *Acanthamoeba*. El tratamiento con crioterapia de las córneas infectadas no está claro. No impidió la recidiva de *Acanthamoeba* tras la queratoplastia en un caso presentado por Samples JR, *et al.*, pero parece ser útil en otros cinco publicados por Binder PS. En estudios in vitro, los quistes fueron resistentes a la crioterapia en el trabajo presentado por Meisler DM, *et al.*, pero en cambio fueron sensibles en los casos presentados por Matoba AY, *et al.* La combinación de crioterapia y antibióticos resultó ser más eficaz que los antibióticos solos.

Aliviar el dolor que se asocia a estas infecciones puede resultar difícil. Se han comunicado algunos éxitos con sulindac, un agente antiinflamatorio no esteroideo. En los casos resistentes se pueden utilizar inyecciones retrobulbares de alcohol. Una inyección de 1 ml, preparada con 1/3 de alcohol absoluto y 2/3 de lidocaína al 2%, proporciona anestesia durante 2 a 4 semanas, con total recuperación. Pueden ocurrir ptosis temporal y otras parálisis nerviosas.

El metronidazol ha sido sugerido como un tratamiento coadyuvante en la queratitis por *Acanthamoeba*. Van der Bijl⁸², de la Universidad de Stellenbosch en Sudáfrica, demostró que la formulación de metronidazol en gel al 0,8% es terapéuticamente ventajosa por el tiempo prolongado que permanece en la córnea.

En el Shandong Eye Institute and Hospital, de China⁸³, se realizó un estudio retrospectivo sobre el tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* con queratoplastia penetrante. Se estudiaron 18 pacientes que no habían respondido previamente al tratamiento médico. En 12 de ellos, el diagnóstico fue realizado antes de la cirugía mientras que en los 6 casos restantes, éste se retrasó hasta los resultados histopatológicos. El promedio de tiempo del curso de la enfermedad antes de la queratoplastia fue de 1 a 4 meses, con lesiones que medían más de 7 mm al momento de la cirugía. Este grupo concluyó que la queratoplastia penetrante es un tratamiento efectivo para las queratitis por *Acanthamoeba* que no respondan al tratamiento médico. De 13 casos que no presentaron recurrencia (72%), 11 habían sido correctamente diagnosticados previamente a la cirugía como queratitis por *Acanthamoeba*. En 5 casos que presentaron recidiva en el trasplante (28%), 4 habían sido incorrectamente diagnosticados antes de la cirugía. Siete casos habían recibido terapia con corticoides durante más de una semana en el período postoperatorio temprano y 4 de ellos desarrollaron recurrencia. En los 4 casos con recaída, 2 habían sido mal diagnosticados de Herpes simple y 2 de queratitis bacteriana. En resumen, este estudio concluye que la precisión en el diagnóstico preoperatorio, la terapia antiamebiana peri-operatoria apropiada y la no utilización de corticoides en el período post-operatorio temprano, pueden disminuir la incidencia de recurrencia de queratitis por *Acanthamoeba* después de la queratoplastia penetrante.

También es posible tratar esta queratitis con membrana amniótica. En el Centre Hospitalier Nacional d'Ophthalmologie des Quinze-Vings de Paris⁸⁴, estudiaron 6 pacientes con queratitis por *Acanthamoeba* severa, dolorosa e incurable, que recibieron trasplante de membrana amniótica en 1 ó 2 ocasiones. Se realizaron 8 procedimientos de membrana amniótica, con un promedio de seguimiento de 14 meses (entre 3 y 21), y un intervalo de tiempo promedio entre la instauración del tratamiento médico y el procedimiento de 3,6 meses. Todos los pacientes presentaban lesiones progresivas en el estroma causadas por la reacción inflamatoria. La reepitelización completa ocurrió en 4 casos, y la curación parcial en 2. La inflamación ocular y la destrucción del tejido disminuyó en todos los casos; el dolor disminuyó en 5 pacientes, y la neovascularización corneal disminuyó en 4 casos. En ningún caso se observaron complicaciones postoperatorias. En conclusión, el trasplante de membrana amniótica puede ser un tratamiento seguro y eficaz en las queratitis severas por *Acanthamoeba*, particularmente durante la fase inflamatoria. Esto permite además, retrasar la queratoplastia penetrante.

Mattana, *et al.*⁸⁵ demostraron en un estudio de la Universidad de Sassari en Italia, la efectividad *in vitro* de la asociación entre la rokitamicina, un macrólido, y la clorpromazina, una fenotiazina, para el tratamiento de la *Acanthamoeba castellanii*. Ambas drogas inhiben el crecimiento de los trofozoítos en forma dosis y tiempo dependientes. La rokitamicina aumenta la actividad de la clorpromazina y de la anfotericina B. De todos modos, bajas dosis de rokitamicina y clorpromazina, solas o en combinación, bloquean el efecto citopático de las células de cultivo corneal infectadas por *Acanthamoeba castellanii*.

En la actualidad, el tratamiento tópico de polihexametilén-biguanida (PHMB) en combinación con propamidina isotionato (Brolene), es considerado la terapia de primera línea para la queratitis por *Acanthamoeba*. Otra alternativa es la terapia de combinación de propamidina y clorhexidina o neomicina que logran buenos resultados terapéuticos. El tratamiento intensivo local mediante la aplicación horaria de las drogas durante los

primeros tres días requiere en muchas ocasiones la hospitalización. No siempre se logra una eficacia suficiente, y también ha sido observada la resistencia contra la propamidina. Recientemente la propamidina ha sido en ocasiones reemplazada por hexamidina, la cual parece tener una gran actividad cisticida. Un estudio reciente ha mostrado que la hexadecilfosfocolina (alquilfosfocolina) es altamente efectiva también contra la *Acanthamoeba*⁸⁶.

El tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* es posible desde la primera terapia de éxito desarrollada en los mediados de 1980 con una combinación de propamidina 0,1% (Brolene) y neomicina 1%. En Glasgow⁸⁷, demostraron gran incremento en la efectividad con la utilización de clorhexidina biguanida 0,02% y en Londres y Bristol encontraron que esa efectividad es similar con polihexametilén-biguanida (PHMB) 0,02%. Ambas biguanidas fueron combinadas con propamidina para aumentar la efectividad pero también mostró ser efectiva como monoterapia. Mientras esta terapia inactiva los quistes y trofozoítos en la mayoría de los pacientes (90%), ha habido numerosos fracasos, particularmente cuando el diagnóstico es tardío y con infección del estroma profundo. Son necesarias drogas con alto poder acanthamoebicida, y este rol podrían adquirirlo ciertas drogas antineoplásicas, como las alquilfosfocolinas (Miltefosine), que también tienen actividad antiprotozoaria.

Recomendaciones

Se recomienda iniciar el tratamiento con una combinación de polihexametilén-biguanida y propamidina. Se alternan las gotas de ambos agentes cada 30 o 60 minutos las 24 horas de los tres primeros días. El resto de la primera semana, las gotas se instilan cada hora durante el día y cada dos horas por la noche. La pauta se reduce gradualmente hasta cuatro veces al día.

Arffa RC¹ recomienda evitar los corticosteroides si es posible. Pueden utilizarse para reducir la inflamación, especialmente si hay reacción intensa en la cámara anterior o glaucoma secundario, y si se está administrando concomitantemente una terapia antiamebiana eficaz. En la mayoría de los casos se requiere tratamiento prolongado, pero no está claro durante cuánto tiempo. Lo recomendable es que dure al menos un año en la mayoría de los casos. Pueden aparecer infiltrados subepiteliales tardíamente en el curso de la enfermedad, a veces al disminuir los antibióticos o los esteroides. Los infiltrados responden a los corticoides tópicos y a veces al tratamiento antibiótico. No se sabe si son de origen inmunológico o infeccioso.

Profilaxis

La correcta higiene de las lentes de contacto probablemente pueda impedir la aparición de la queratitis por *Acanthamoeba*. Se deben evitar las soluciones salinas de fabricación casera, el agua del grifo y la saliva. Los pacientes no deben nadar con las lentes de contacto. También, si se evita la contaminación bacteriana y fúngica de las lentes, de los estuches de las mismas y de las soluciones, probablemente se pueda prevenir la infección por *Acanthamoeba*. La desinfección por calor destruye los trofozoítos y los quistes del parásito. Los sistemas de desinfección con peróxido de hidrógeno se mostraron eficaces si no contenían un catalizador metálico y si la exposición era de un mínimo de dos horas. La clorhexidina y el benzalconio tienen un efecto variable. Parecen destruir los trofozoítos y los quistes en algunos casos aislados, pero en otros no son eficaces. El timerosal, el ácido ascórbico, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y los compuestos del amonio cuaternario, suelen ser ineficaces.

Un estudio realizado en la Universidad de Texas publicado en febrero del 2005⁸⁸, mostró que la queratitis por *Acanthamoeba* está profundamente afectada por proteínas dependientes de la manosa encontradas en la superficie ocular, la cual estimula a la *Acanthamoeba* para que elabore una proteasa patógena de 133-kDa. Las proteasas inducidas por la manosa (MIP133), median la apoptosis del epitelio corneal, facilitan la invasión corneal, y degradan el estroma corneal. Demostraron que en los portadores de lentes de contacto aumenta la sensibilidad de las proteínas dependientes de la manosa en el epitelio corneal, estimulan la secreción de MIP133, y presentan una exacerbación de la enfermedad corneal. El *Cornebacterium xerosis*, un germen habitual de la flora ocular, contiene grandes cantidades de manosa y se asocia con la queratitis por *Acanthamoeba*, produciendo también un incremento en las cantidades de MIP133 y hacen más severa la enfermedad corneal. Todo esto lleva a que en un futuro, se estudie la inmunización oral con MIP133 que mitigaría la queratitis por *Acanthamoeba*, y que se evalúe la viabilidad de una vacuna de anticuerpos contra patógenos que se resisten a la eliminación.

En un estudio realizado en la Universidad de Graz en Austria⁸⁹, se compararon la efectividad de las soluciones de lentes de contacto a base de peróxido de hidrógeno en uno y dos pasos en la desinfección de la *Acanthamoeba*. Se concluyó que los sistemas a base de peróxido de hidrógeno de un paso no tienen el efecto desinfectante suficiente sobre los quistes de *Acanthamoeba* y por lo tanto, no pueden proteger al usuario de lentes de contacto de una posible infección ocular. De todos modos, nuevos sistemas de un paso, compuestas por sustancias catalíticas (Blue Vision), podrían tener un mejor efecto cisticida. Por contra los sistemas en dos pasos destruyeron completamente los quistes de *Acanthamoeba*.

Lim⁹⁰, desde Singapur, publicó un caso de queratitis por *Acanthamoeba* en ojo derecho que fue posteriormente intervenido tras su curación con foto-queratomileusis con láser in situ (LASIK) para la corrección de su miopía. Esta paciente presentaba una historia de uso de lentes de contacto blandas de uso diario y un episodio de queratitis por *Acanthamoeba* en fase epitelial, que se resolvió en cinco meses con tratamiento tópico de polihexametilén-biguanida y propamida. No presentó recurrencias después del primer episodio ni cicatriz corneal residual. El LASIK fue realizado en ambos ojos luego de dos años de la queratitis. Después de tres meses de seguimiento, no se han presentado recurrencias.

Clairhout, et al. en Bélgica⁹¹, demuestran que un retraso en el diagnóstico de la queratitis por *Acanthamoeba* menor de 18 días entre el origen de la sintomatología y el comienzo del tratamiento, resulta en una mejor agudeza visual final tras el tratamiento médico y obvia la necesidad de realizar queratoplastia penetrante. De ahí la gran importancia en realizar un diagnóstico precoz. Como conclusión pretendemos enviar un mensaje que, aunque quizás sea demasiado axiomático, podría resumir bien nuestra amarga experiencia con la enfermedad en casos avanzados: toda queratitis en un paciente joven portador de lentes de contacto con higiene irregular que no cura en una o dos semanas con tratamientos habituales y simula un herpes simple es una queratitis por *Acanthamoeba* mientras no se demuestre lo contrario. El retraso en el diagnóstico conduce muchas veces a un calvario de cirugías y a la pérdida del globo ocular en un número importante de casos.

Bibliografía

- Arffa RC. Queratitis infecciosa: fúngica y parasitaria. En: *Enfermedades de la córnea*. Madrid: Harcourt Brace, 1999;257-82.
- Alizadeh H, Niederkorn JY, McCulley JP. Acanthamoebic Keratitis. En: Pepose JS, et al. *Ocular Infection & Immunity*. St Louis: Mosby, 1996;1062-71.
- Rösel von Rosenhof AJ. Der kleine Proteus, Der Monat-herausgeg. *Infekten-Belustigungen* 1755;3:162.
- Douglas RG, et al. Rhinovirus neutralizing antibody in tears, parotid saliva nasal secretions and serum. *J Immunol* 1967;99:297.
- Franchini G. Sur une amibe de la laticue (Laticue Saliva). *Bull Soc Pathol Exot* 1922;15:784.
- Martínez AJ. Free-living amoeba: pathogenic aspects, a review. *Protozool Abst* 1983;7:293.
- Ubelaker JE. *Acanthamoeba* spp.: "Opportunistic pathogens". *Trans Am Micros Soc* 1991;110:289.
- Curons RTM, Brown TJ. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J Clin Pathol* 1978;31:1.
- Douglas M. Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of a yeast-like fungus. *J Trop Med Hyg* 1930;33:258.
- Volkonsky M. Hartmannella castellanii Douglas, et classification des hartmannelles. *Arch Zool Exp Gene* 1931;72:317.
- Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba* polyphaga keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1975;95:221.
- Hirst LW, et al. Management of *Acanthamoeba* Keratitis: a case report and review of the literature. *Ophthalmology* 1984;91:1105.
- Florakis GJ, et al. Elevated epithelial lines in *Acanthamoeba* keratitis. *Arch Ophthalmol* 1988;106:1202.
- Warhurst DC. Pathogenic free-living amoebae. *Parasitol Today* 1985;1:24.
- Wang SS, Feldman HA. Isolation of Harmanella species from human throats. *N Engl J Med* 1967;277:1174.
- Rivera, et al. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ Res* 1984;33:428.
- Ludwig HI, et al. Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:626.
- Martínez AJ. Free-living amoeba: pathogenic aspects, a review. *Protozool Abst* 1983;7:293.
- Shuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004;34(9):1001-27.
- Martínez AJ, Janitschke K. *Acanthamoeba*, an opportunist microorganism: a review. *Infection* 1985;13:251.
- Jones DB. *Acanthamoeba*-the ultimate opportunist? *Am J Ophthalmol* 1986;102:527.
- Na BK, Kim JC, Song CY. Characterization and pathogenic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *Microb Pathog* 2001;30(1):39.
- Khan NA, Jarrol EL, Panjwani N, Cao Z, Paget TA. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and non pathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):2858-61.
- Walocknik J, Sommer K, Obwallner A, Haller-Schober EM, Aspöck H. Characterization and differentiation of pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. *Parasitol Res* 2004;92(4):289-98.
- Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect Immun* 2003;71(11):6243-55.
- Alizadeh H, Neelam S, Hurt M, Niederkorn J. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect Immun* 2005;73(2):1061-8.
- Khan NA. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* 2001;43(6):391-5.
- Walocknik J, Haller-Schober E, Kolli H, Picher O, Obwallner A, Aspöck H. Discrimination between clinically relevant and non relevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):3932-6.
- Hansen B, Kronborg G. *Acanthamoeba* keratitis in a non-contact lens wearer with immunodeficiency virus. *Scand J Infect Dis* 2003;35(3):207-9.
- Tandon R, Vajpayee RB, Gupta V, Vajpayee M, Satpathy G, Dada T. Polymicrobial keratitis in an HIV-positive patient. *Indian J Ophthalmol* 2003;51(1):87-8.
- Giovannini A, Tittavelli R, Bertelli E, et al. Bilateral *Acanthamoeba* keratitis in a gas-permeable contact lens wearer. *Ophthalmologica* 1994;208:321-4.
- Cardine S, Bourcier T, Chaumeil C, Zamfir O, Borderie V, Laroche L. Clinical management and prognosis in *Acanthamoeba* keratitis: a retrospective study of 25 cases. *J Fr Ophthalmol* 2002;25(10):1007-13.
- Moore MB, McCulley JP. *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses: six consecutive cases of successful management. *Br J Ophthalmol* 1989;73:271.
- Moore MB, et al. *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am J Ophthalmol* 1985;100:396.

35. Stehr-Green JK, *et al.* *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers: a case control study. *JAMA* 1987;258:57.
36. Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beechin JR, Frazer DG, Matheson M. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):165-9.
37. Bialasiewicz AA, Bischoff G, Walter A, Engelmann K, Richard G. Correlation of 55 samples of contact lens fluid and direct swabbings of the eye surface of symptomatic wearers of contact lens. *Ophthalmologie* 2001;98(8):747-60.
38. Seal DV. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* 2003;17(8):893-905.
39. Xuguang S, Lin C, Yan Z, Zhiqun W, Ran L, Shiyun L, Xiuying J. *Acanthamoeba* keratitis as a complication of orthokeratology. *Am J Ophthalmol* 2003;136(6):1159-61.
40. Lu L, Zou L, Wang R. Orthokeratology induced infective corneal ulcer. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2001;37(6):443-6.
41. John T, Desai D, AND Sam D. Adherence of *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites to extended wear soft contact lenses. *Ref Infect Dis* 1991;13(suppl 5):S419.
42. Larkin DFP, Kilvington S, Easty DL. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *Br J Ophthalmol* 1990;74:133.
43. Larkin DFP, Easty DL. External eye flora as a nutrient source for *Acanthamoeba*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990;28:458.
44. Stopak SS, *et al.* Growth of *Acanthamoeba* on human corneal epithelial cell and keratocytes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:354.
45. He Y, *et al.* In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2235.
46. Butler TK, Males JJ, Robinson LP, Wechsler AW, Sutton GL, Cheng J, Taylor P, McClellan K. Six-year review of *Acanthamoeba* keratitis in New South Wales, Australia: 1997-2002. *Clin Experiment Ophthalmol* 2005;33(1):41-6.
47. Lam DS, Houang E, Fan DS, Lyon D, Seal D, Wong E. Hong Kong Microbial Keratitis Study Group: Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. *Eye* 2002;16(5):608-18.
48. Houang E, Lam D, Fan D, Seal D. Microbial Keratitis in Hong Kong: relationship to climate, environment and contact-lens disinfection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(4):361-7.
49. Auran JD, Starr MB, Jacobiec FA. *Acanthamoeba* keratitis: a review of the literature. *Cornea* 1987;6:2.
50. Tabin G, Taylor H, Snibson G, Murchison A, Gushchin A, Rogers S. Atypical presentation of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 2001;20(7):757-9.
51. Roters S, Aisembrey S, Severin M, Konen W, Seitz HM, Krieglstein GK. Painless *Acanthamoeba* keratitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001;218(8):570-3.
52. Feist RM, Sugar J, Tessler H. Radial Keratoneuritis in Pseudomonas keratitis. *Arch Ophthalmol* 1991;109:774.
53. Moore MB, *et al.* Radial keratoneuritis as a presenting sign in *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 1986;93:1310.
54. Froumis NA, Mondino BJ, Glasgow BJ. *Acanthamoeba* keratitis associated with fungal keratitis. *Am J Ophthalmol* 2001;131(4):508-9.
55. Kim SK, Dohlman CH. Causes of enlarged corneal nerves. *Int Ophthalmol Clin* 2001;41(1):13-23.
56. Rumelt S, Cohen I, Rehany U. Spontaneous corneal graft ulcerative perforation due to mixed *Acanthamoeba* and herpes simplex keratitis: a clinicopathologic study. *Cornea* 2000;19(2):240-2.
57. Gajdatsy AD, Kosmin A, Barret GD. Coexistent adenoviral keratoconjunctivitis and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000;28(6):434-6.
58. Stopak SS, *et al.* Growth of *Acanthamoeba* on human corneal epithelium cells and keratocytes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:354.
59. Garner A. Pathology of acanthamoebic infection. En: Cavanagh HD, editor: *The cornea: transactions of the world congress on the cornea III*. New York: Raven Press, 1988;535-9.
60. Mathers, *et al.* Immunopathology and electron microscopy of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 1987;103:626.
61. Cursons RTM, Brown TJ. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J Clin Pathol* 1978;31:1.
62. Larkin DFP, Berry M, Easty DL. In vitro corneal pathogenicity of *Acanthamoeba*. *Eye* 1991;5:560.
63. Van Klink F, Alizadeh H, Stewart GL, *et al.* Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. *Curr Eye Res* 1992;11:1207-20.
64. Chang SL. *Small, free-living amoebae: cultivation, quantitation, identification, pathogenesis, and resistance. Current topics in comparative pathobiology*. New York: Academic Press, 1971:202-54.
65. Yong JDF, Lowrey DM. Biochemical and functional characteristics of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 1989;164:1077.
66. Young JDF, Liu CC. Multiple mechanisms of lymphocytic mediated killing. *Immunol Today* 1988;9:140.
67. Gitler C, Calef E, Rosemberg I. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Philos Trans R Soc Lond* 1984;B307:73.
68. He YG, *et al.* In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2235.
69. Ferrante A. Free-living amoeba: pathogenicity and immunity. *Parasit Immunol* 1991;13:31.
70. Ferrante A, Rowan-Kelly B. Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clin Exp Immunol* 1983;54:477.
71. Stewart GL, *et al.* Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependant macrophage-mediated killing of the parasite. *J Parasitol* 1992;78:849.
72. Whitman LY, Marciano-Cabral F. Susceptibility of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. to complement mediated lysis. *Infect Immun* 1987;55:2442.
73. Ferrante A. Immunity to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991;13(suppl 5):S403.
74. Larkin DFP, Easty DL. Experimental *Acanthamoeba* keratitis: immunohistochemical evaluation. *Br J Ophthalmol* 1991;75:421.
75. Font RL, *et al.* An animal model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20(suppl):8.
76. Schlaegel TF, Culbertson CG. Experimental Hartmannella optic neuritis and uveitis. *Ann Ophthalmol* 1972;4:103.
77. Badenoch PR, *et al.* Pathogenicity of *Acanthamoeba* and *Corynebacterium* in the rat cornea. *Arch Ophthalmol* 1990;108:107-12.
78. Niederkorn JY, *et al.* Susceptibility in corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:104.
79. Butler TK, Males JJ, Robinson LP, Wechsler AW, Sutton GL, Cheng J, Taylor P, McClellan K. Six-year review of *Acanthamoeba* keratitis in New South Wales, Australia: 1997-2002. *Clin Experiment Ophthalmol* 2005;33(1):41-6.
80. Nakano E, Olivera M, Portellinha W, de Freitas D, Nakano K. Confocal microscopy in early diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Refract Surg* 2004;20(5 Suppl):S737-40.
81. Sharma S, Pasricha G, Das D, Aggarwal RK. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India: DNA typing-based validation and a simple detection assay. *Arch Ophthalmol* 2004;122(10):1430-4.
82. Van der Bijl P, van Eyk AD, Seifart HI, Meyer D. Diffusion of metronidazole released from aqueous solution and a gel through human and rabbit corneas. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20(5):421-9.
83. Shi WY, Gao H, Li SW, Wang FH, Xie LX. Clinical study of treatment of *acanthamoeba* keratitis by penetrating keratoplasty. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2004;40(11):750-4.
84. Bourcier T, Patteu F, Borderie V, Baudrimont M, Rondeau N C, Bonnel S, Chaumeil C, Laroche L. Amniotic membrane transplantation for the treatment severe *acanthamoeba* keratitis. *Can J Ophthalmol* 2004;39(6):621-31.
85. Mattana A, Biancu G, Alberti L, Accardo A, Delogu G, Fiori PL, Cappuccinelli P. In vitro evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamicin and chlorpromazine against *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12):4520-7.
86. Walochnik J, Duchene M, Eibl H, Aspöck H. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis: possibilities, problems, and new approaches. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115 Suppl 3:10-7.
87. Seal D. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003;1(2):205-8.
88. Alizadeh H, Neelam S, Hurt M, Niederkorn JY. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect Immun* 2005;73(2):1061-8.
89. Hiti K, Walochnik J, Fasching E, Haller-Schober EM, Aspöck H. One-and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: How effective are they?. *Eye* 2004;12.
90. Lim L, Wei Rh. Laser in situ keratomileusis treatment for myopia after *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens* 2004;30(2):103-4.
91. Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Ophthalmol* 2004;42(8):648-53.