

LABORATORIO

AISLAMIENTO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE CAPACES DE PRODUCIR MENINGOENCEFALITIS



Laureano Echandi *
Débora González L. **
Roberto Marín R. ***

SUMMARY

A study of 500 patients of external consult of the Clinic "Dr. Marcial Fallas D." coming from Desamparados, Aserrí and San Ignacio yielded as a result the isolation of 20 stocks of free-living amoebae capable of producing meningoencephalitis in mankind. Furthermore 12 of the stocks of the nasal mocus were isolated. The 32 stocks isolated were of the genere Acanthamoeba, but only two were pathogenous for the mice, at being inoculated via intranasal and intrabrain. The frequency of colonization of human beings by this type of amoebae is considered important, due to the fact that, even though clinical cases have not been reported in Costa Rica, they are potentially capable of producing meningoencephalitis. A major

frequency was found in women more than in men, which is related to the domestic labors of them in our rural zone.

INTRODUCCION

En 1958, Culbertson (5), observó que las amebas de vida libre del género Acanthamoeba eran capaces de producir meningoencefalitis fulminante en ratones, al ser instaladas intranasalmente. Fowler y Carter en 1965 (6), descubrieron en Australia los primeros casos humanos de meningoencefalitis producidos por este tipo de amebas. En 1966, Butt (1), descubrió la infección por Naegleria en un caso humano de meningoencefalitis fatal. En Costa Rica también se ha estudiado la presencia de amebas de vida libre en portadores sanos; es así como la primera evidencia real de este grupo de amebas la dieron Chinchilla y colaboradores en 1979 (3), cuando informó de su presencia en estudiantes universitarios. En

* Clínica Dr. Marcial Fallas D.

** Hospital Dr. Max Peralta J.

*** Hospital de Guápiles

otros estudios del mismo grupo de investigadores, se demuestra la presencia de dichos protozoarios en aguas de piscinas, como contaminantes en vegetales, en líquidos cefaloraquídeos de pacientes internados en el Hospital Nacional de Niños, y en frotis nasales y fecales de pacientes internados en el Hospital San Juan de Dios (4). Con base en estos antecedentes, este estudio pretende hacer una revisión de pacientes de consulta externa de una área localizada, demostrando de esa manera la prevalencia de las amebas entre población de tipo ambulatorio.

MATERIAL Y METODOS

Fueron estudiados 500 pacientes de la Consulta externa de la Clínica Dr. Marcial Fallas D., Costa Rica, la cual atiende pacientes de las zonas de Desamparados, Aserrí y San Ignacio de Acosta, cuyas edades oscilaron entre los 7 y 82 años. Los cuales fueron interrogados según cuestionario que correlaciona los factores biológicos y epidemiológicos (3). Le fueron tomadas a cada paciente, muestras de moco nasal y de heces. La primera se tomó con ayuda de torundas de algodón, las cuales permanecieron en las fosas nasales por 30-60 segundos, las segundas les fueron solicitadas a los pacientes en recipientes adecuados. El moco nasal se inoculó en placas de Petri que contenían medio sólido de HAN (3), previamente inoculadas con cultivo de 18 horas de Escherichia coli en agar nutritivo, según método de Visvesvara (10). Las placas se incubaron a temperatura ambiente ($21 \pm 1.5^\circ\text{C}$) hasta por 8 días, para observar el crecimiento de amebas. Las muestras de heces se sembraron por rayado en placas de Petri con medio sólido de HAN sin bacterias. Se incubaron por el mismo período de tiempo y a la misma temperatura que las muestras nasales, con el fin de observar la presencia de amebas. Tanto la muestra nasal como fecal que dieron crecimiento positivo por amebas de vida libre, fueron sembradas en medio de HAN con Escherichia coli con el fin de observar crecimiento a 37 y $44 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Las

amebas que demostraron capacidad de crecimiento a $44 \pm 0.2^\circ\text{C}$ se inocularon en medio de Chang (2) para crecimiento axénico. De las cepas que crecieron en medio de Chang se tomaron trofozoitos, los cuales fueron lavados en solución salina fisiológica y centrifugados tres veces, durante diez minutos a 2500 r.p.m. El sedimento obtenido, rico en trofozoitos, según observación microscópica, fue inoculado en ratones blancos, cepa Wistar de 22 días de nacidos. Cada cepa de ameba se inoculó en tres ratones por vía intranasal (i.n.), utilizando una jeringa de tuberculina y una aguja de 26 Ga, 1/2 I, para instalar el material; y tres por vía intracerebral (i.c.), con el mismo tipo de aguja. Los animales inoculados fueron mantenidos en observación hasta por un mes, cada vez que uno de ellos se enfermó, se intentó evidenciar signos meníngeos, efectuando necropsia al morir, para observar la presencia de abscesos de cerebro y pulmón. Porciones de cada uno de los órganos fueron cultivados en medio de HAN sólido para aislar las amebas, en caso negativo fue considerada NO PATOGENA la cepa inoculada. El mismo proceso se siguió con los animales que sobrevivieron al mes.

RESULTADOS

De las 500 personas estudiadas, 20 presentaron amebas de vida libre en heces y 12 en moco nasal (Cuadro #1). Todas las cepas aisladas correspondieron al género Acanthamoeba, según la clave taxonómica de Page (9). De las cepas Acanthamoeba aisladas, 5 crecieron a 44°C (15.6%) y 2 en el medio de Chang (6.2%). Las que crecieron en este último fueron patógenas para ratones al ser inoculadas tanto intranasal como intracerebralmente. En cuanto a sexo, el femenino (7.1%) mostró mayor porcentaje de aislamiento que el masculino (4.9%). Solamente las cepas que crecieron en medio de Chang fueron inoculadas en ratones, ya que por experiencia se ha demostrado que las amebas que no crecen en este medio no producen patología.

CUADRO 1
MUESTREO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE
PATOGENAS SEGUN SEXO DE LOS PACIENTES.

TIPO MUESTRA	PRESENCIA DE AMEBAS	SEXO				TOTAL	
		Masculino		Femenino		#	%
		#	%	#	%		
FECAL	Positivo	4	0.8	16	3.2	20	4
	Negativo	159	31.8	321	64.2	480	96
NASAL	Positivo	4	0.8	8	1.6	12	2.4
	Negativo	159	31.8	329	65.8	488	97.6

DISCUSION

El presente estudio, que es el tercero sobre este tema en Costa Rica, pone en manifiesto un porcentaje de aislamiento de las amebas de vida libre similar al reportado por Chinchilla y colaboradores 6.4% (4). En nuestro país, la frecuencia de colonización de humanos por amebas de vida libre capaces de producir meningoencefalitis, es importante a pesar de que aún no se han reportado casos clínicos. Es importante notar que, en los dos estudios anteriores, similares al presente, no se demostró una diferencia de aislamiento en cuanto a sexo, sin embargo, en este, la diferencia es significativa, 7.1% para mujeres y 4.9% para hombres. A pesar de que no se conocen las causas de esta diferencia, es importante considerar la labor doméstica de tipo rural (lavar en ríos, cultivo de hortalizas, cría de gallinas y de otros animales domésticos) como un factor importante, la gran mayoría de los pacientes son de zona rural, en la que hay gran diseminación de dichas amebas en el ambiente (4, 8). Reforzamos la hipótesis propuesta por Chinchilla y colaboradores (3), quienes piensan de la existencia de otros agentes, aparte del agua de piscinas y ríos como vehículos de entrada de estas amebas al organismo humano, debido a que no todos los portadores han tenido contacto con tales aguas. Es importante resaltar el hecho de que Chinchilla y colaboradores en 1979 (3), reportaron únicamente dos cepas de amebas de vida libre de origen nasal, y en 1981

(4), los mismos investigadores reportaron también dos cepas de origen nasal; mientras que en nuestro estudio se encontraron 12 cepas del mismo origen, y creemos que la presencia de este hecho se debe a un ligero cambio en la recolección de la muestra, ya que se dejaron las torundas por espacio de 30-60 segundos en cada fosa nasal, con lo que la posibilidad de que los trofozoitos se adhieran al algodón fue mayor, por lo que se aumentó el porcentaje de aislamiento.

RESUMEN

Se realizó un estudio de 500 pacientes de consulta externa de la Clínica Dr. Marcial Fallas, provenientes de Desamparados, Aserrí y San Ignacio de Acosta, cuyo objetivo fue el aislamiento de amebas de vida libre, ya que dichas amebas son potencialmente capaces de producir meningoencefalitis en el hombre. Fueron aisladas 32 cepas todas del género *Acanthamoeba*, de las cuales 20 fueron aisladas en heces y 12 en moco nasal, no obstante, sólo dos fueron patógenas para los ratones, al ser inoculados por las vías nasal e intracerebral. La frecuente colonización de seres humanos por este tipo de amebas ha sido considerada de gran importancia, ya que, la posibilidad de ser agentes productores de meningoencefalitis no se debe descartar en nuestro medio, a pesar de que aún no se han reportado casos clínicos en Costa Rica. Se encontró mayor frecuencia en mujeres que en hombres, probablemente relacionado con las labores domésticas de la mujer en área rural.

BIBLIOGRAFIA

1. Butt, C.G.' Bavo, C.' Knott, R.W. *Naegleria sp* Identified in amoebic meningoencephalitis. *N. Engl. J.M.* 1966; 274: 1473-1476.
2. Chang, S.L. Ethiological, pathological, and diagnostical considerations of primary amoebic meningoencephalitis. C.R.C. Crist. *Rev. Microbiol.* 1974; 4:135-139.
3. Chinchilla, M.; Castro, E.; Alfaro, M.; Portilla, E. Amebas de vida libre productoras de meningoencefalitis. Primeros hallazgos en Costa Rica. *Rev. Latin Microbiol.* 1979; 21:135-142.

4. Chinchilla, M.; Alfaro, M.; Marín, R.E.; Guerrero, O.M.; Portilla, E. Amebas productoras de meningoencefalitis en el hombre. Estudio epidemiológico en Costa Rica. Primeras jornadas de investigación, U.C.R. 1981; pág.: 208-209.
5. Culbertson, C.O.; Smith, J.W.; Minner, J.R. Acanthamoeba observations on animal pathogenicity. Science, 1958; 127:1506.
6. Fowlwe, M.; Carter, R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp.: a preliminary report. Hrit. J.M. 1965; 2:740-742.
7. Jardin, J.B.; Willaert, E.; Hermanne, J. Presence d'amibes limax dans l'intestin de l'homme et des animaux. Arsam. Bull. Seances, 1973; 3:520-526.
8. Kingston, D.; Warhurst, D.C. Isolation of amoebae from the air. J. Med. Microbiol. 1969; 2:27-36.
9. Page, F.C. Taxonomic criteria for limas amoebae. In Manual of Clinical Microbiology, Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1980; Pág.:740-708.
10. Visvesvara, G. Free-living pathogenic amoebae. In Manual of Clinical Microbiology, Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1980; Pág.:704-708.