

AMEBAS DE VIDA LIVRE (*NAEGLERIA* SP. E *ACANTHAMOEBA* SP.)
ISOLADAS DE FEZES HUMANAS: PATOGENICIDADE
PARA CAMUNDONGOS *

Sylvia Amaral Gurgel VELLOSA **
Antonella Godano SCHLODTMANN **
Venâncio Avancini Ferreira ALVES ***
Ana Célia Steffen MANGINI **

RIALA6/575

VELLOSA, S. A. G.; SCHLODTMANN, A. G.; ALVES, V. A. F. & MANGINI, A. C. S. — Amebas de vida livre (*Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.) isoladas de fezes humanas: patogenicidade para camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1): 67-72, 1984.

RESUMO: Foram inoculadas, em lotes de 5 camundongos albinos de 10 a 12 g, 15 amostras de *Acanthamoeba* sp., 2 amostras de culturas mistas de *Acanthamoeba* sp. e *Naegleria* sp. e uma amostra de *Naegleria* sp. As amebas foram isoladas a partir de fezes de indivíduos pertencentes a uma creche da cidade de São Paulo. Os camundongos foram ligeiramente anestesiados com éter etílico e receberam, por via nasal, 0,04 ml de uma suspensão de amebas na concentração de 3×10^5 a 8×10^6 trofozoítas por ml. Seis camundongos morreram espontaneamente e os restantes foram sacrificados após 30 dias de observação. Macerados de cérebro, baço e pulmão foram repicados em placas de Petri contendo ágar não nutriente e ágar não nutriente-sal, com tapete de *Aerobacter aerogenes* morto pelo calor. Subseqüentemente as placas foram incubadas às temperaturas de 28 e 37 °C e observadas por 10 dias. Constatou-se a patogenicidade de 4 amostras de *Acanthamoeba* sp e de uma amostra de cultura mista de *Acanthamoeba* sp e *Naegleria* sp. Alguns dos fragmentos teciduais não macerados foram analisados histopatologicamente, revelando-se processo inflamatório com predomínio de linfócitos, plasmócitos e histiócitos, caracterizando-se, em alguns focos, a presença de amebas de vida livre.

DESCRITORES: amebas de vida livre, isolamento de fezes humanas; *Naegleria* sp., *Acanthamoeba* sp., patogenicidade em camundongos (estudo experimental).

INTRODUÇÃO

A importância etiológica de amebas de vida livre na morbidade por meningites e meningoencefalites já foi definitivamente demonstrada 4, 8, 9, 10, 12.

Infecções cerebrais por *Acanthamoeba* são geralmente descritas como meningoencefalite subaguda ou crônica, por vezes de padrão granulomatoso, podendo resultar em óbito do paciente após 8 dias ou em até vários meses

de evolução 3. A maioria dos casos de meningoencefalite granulomatosa ocorre em imunodeprimidos, alcoólatras, diabéticos ou em outra forma de doença debilitante.

A meningoencefalite por *Naegleria* sp. atinge, preferencialmente, crianças ou adultos jovens, saudáveis, com antecedentes de contato com águas de piscina, lagos ou rios. Um quadro de meningoencefalite fulminante é observado, resultando em óbito em menos de uma semana.

* Realizado no Serviço de Parasitologia e na Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP.

** Do Serviço de Parasitologia.

*** Da Divisão de Patologia.

A presença de anticorpos específicos em pacientes com distúrbios das vias aéreas superiores ou gastrintestinais, e a alta prevalência de amebas de vida livre em crianças, sugerem a existência de infecções inaparentes por *Acanthamoeba* sp. e *Naegleria* sp.^{7,9}.

O objetivo do presente trabalho foi pesquisar a patogenicidade, em camundongos, das amebas de vida livre pertencentes aos referidos gêneros, isoladas de fezes de indivíduos aparentemente saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

A patogenicidade de amebas de vida livre, isoladas a partir de fezes humanas, foi testada em camundongos, modelo animal que mimetiza as condições humanas.

Foram empregadas 15 amostras pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, uma pertencente ao gênero *Naegleria* e 2 culturas mistas dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* isoladas a partir de fezes de indivíduos pertencentes a uma creche da cidade de São Paulo¹¹. As amebas foram mantidas em meio de ágar não nutritivo a 1,5%, em água destilada, recoberto por tapete de *Enterobacter aerogenes* (CDC1535) morto pelo calor (ANNE), conforme técnica descrita por ANDERSON & JAMIESON¹.

Para o preparo da suspensão a ser inoculada, o crescimento das amebas foi estimulado pelo repique em cinco placas contendo ANNE. Estas placas foram incubadas por 24 horas em temperatura correspondente à do isolamento da amostra. A concentração do inóculo foi ajustada entre 3×10^5 e 8×10^6 trofozoítas por ml, através de contagem em câmara de Neubauer.

Foram inoculados 5 camundongos albinos, de 10 a 12 g de peso, para cada amostra testada. Os animais foram previamente anestesiados pelo éter etílico. Procedeu-se à inoculação depositando-se 0,04 ml de suspensão em suas narinas, segundo técnica preconizada por MARTINEZ *et alii*³. Os camundongos pertencentes ao grupo-testemunha receberam 0,04 ml de água destilada estéril. Foi utilizado, ainda, outro grupo de camundongos que foram inoculados por via nasal com 0,04 ml de suspensão de *Acanthamoeba* sp. (cepa F415) patogênica para camundongos, fornecida pelo Dr. Hércules de Moura, do Departamento de Parasitologia e Laboratórios da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Todos os animais foram observados por um período de 30 dias.

Macerados de cérebro, baço e pulmão dos camundongos inoculados foram semeados no centro de duas placas contendo ANNE e em uma contendo ANNE mais 0,85% de cloreto de sódio (ANNE — sal). As placas de ANNE foram incubadas a 28 e 37 °C

durante 10 dias, e a de ANNE — sal, a 37 °C, pelo mesmo período. A observação direta das placas foi feita com auxílio de microscópio invertido, com aumento de 130 vezes. Amebas foram reisoladas de pontos distantes do local de semeadura, e a identificação morfológica foi processada segundo critério de PAGE⁷.

Considerou-se fortemente patogênica (++) a amostra que, uma vez inoculada, resultou em morte espontânea de pelo menos um camundongo, tendo sido positiva a cultura de amebas a partir de cérebro, pulmão e/ou baço (retrocultura). No caso de ter sido positiva a retrocultura sem que tivesse sido verificada a morte espontânea de qualquer camundongo, considerou-se a amostra como moderadamente patogênica (+). Quando não se obteve retrocultura positiva nem ocorreu morte de qualquer camundongo, a amostra foi considerada não patogênica.

Em 19 dos 32 camundongos em que foi positiva a cultura de *Acanthamoeba* sp., foram realizadas análises histopatológicas de fragmentos de tecido do sistema nervoso central, corados pela hematoxina-eosina (H.E.) e pelo ácido periódico de Schiff (P.A.S.).

RESULTADOS

Foram inoculados 90 camundongos com as dezoito amostras de amebas de vida livre já relacionadas anteriormente. Sete camundongos evoluíram espontaneamente para o óbito e 83 foram sacrificados pelo éter ao final de 30 dias de observação. O cultivo do cérebro, baço e pulmão desses camundongos resultou positivo em 6 dos que tiveram morte espontânea e em 26 dos que foram sacrificados, conforme é demonstrado na tabela 1.

A distribuição de positividade, traduzida pelo reisolamento das amebas de vida livre, a partir de cérebro, baço e pulmão dos camundongos inoculados (retrocultura) variou de acordo com a natureza da amostra inoculada, com o tipo de órgão cultivado e com a temperatura de cultivo, conforme mostra a tabela 2.

Dos 79 reisolamentos, 43 (54%) foram obtidos em cérebro, 29 (37%) em pulmão e 7 (9%) em baço.

O grau de patogenicidade para camundongo, observado nas quinze amostras de *Acanthamoeba* sp., está demonstrado na tabela 3. Das duas culturas mistas, apenas uma resultou fortemente patogênica, com morte espontânea de 2 camundongos, com retrocultura positiva para *Naegleria* sp. no baço cultivado, a 28 °C, e para *Acanthamoeba* sp. também no baço cultivado, a 37 °C. A amostra de *Naegleria* sp. não foi patogênica para camundongos, não sendo tampouco reisolada a partir de órgãos semeados.

TABELA 1

Retrocultura de Acanthamoeba sp., Naegleria sp. e culturas mistas de ambas (obtidas a partir de cérebro, baço e pulmão de camundongo) inoculadas em lotes de 5 camundongos, segundo óbito

Retroculturas Óbito	<i>Acanthamoeba</i> sp. (15 amostras)			<i>Acanthamoeba</i> sp. e <i>Naegleria</i> sp. (2 amostras)			<i>Naegleria</i> sp. (1 amostra)			Total geral		
	Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Total
Espontâneo	4	1	5	2	—	2	—	—	—	6	1	7
Provocado pelo éter	26	44	70	—	8	8	—	5	5	26	57	83
Total	30	45	75	2	8	10	—	5	5	32	58	90

TABELA 2

Retroculturas positivas de amebas em cérebro, pulmão e baço de camundongos, segundo a temperatura, óbito e amostra inoculada

Amostra inoculada	Óbito	Retroculturas									Total
		Cérebro			Pulmão			Baço			
		ANNE	ANNE	ANNE-sal	ANNE	ANNE	ANNE-sal	ANNE	ANNE	ANNE-sal	
		28 °C	37 °C	37 °C	28 °C	37 °C	37 °C	28 °C	37 °C	37 °C	
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Pelo éter	4	2	2	3	3	3	3	2	1	22
	Espontâneo	20	10	5	10	5	2	—	—	—	52
<i>Acanthamoeba</i> sp. e <i>Naegleria</i> sp.	Pelo éter	—	—	—	1	1	1	1	—	1	5
Total	—	24	12	7	14	9	6	3	2	2	79

VELIOSA, S. A. G.; SCHIÖDTMANN, A. G.; ALVES, V. A. F. & MANGINI, A. C. S. — Amebas de vida livre (*Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.) isoladas de fezes humanas: patogenicidade para camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1): 67-72, 1984.

VELLOSA, S. A. G.; SCHLODTMANN, A. G.; ALVES, V. A. F. & MANGINI, A. C. S. — Amebas de vida livre (*Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.) isoladas de fezes humanas: patogenicidade para camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1): 67-72, 1984.

Amostras teciduais de sistema nervoso central, oriundas de dois camundongos que evoluíram espontaneamente para o óbito, foram submetidas a exame histológico encontrando-se nelas meningoencefalite mononuclear, com áreas de necrose parenquimatosa. A pesquisa de *Acanthamoeba* sp. foi positiva em quantidade moderada nas duas amostras. A análise histopatológica de amostras teciduais de sistema nervoso central, oriundas de 17 camundongos sacrificados, revelou encefalite mononuclear discreta em 5 amostras, uma das

quais com esboço granulomatoso; em três desses casos foram detectadas raras *Acanthamoeba* sp. Em outros cinco casos, comprovou-se a existência de meningite mononuclear focal, em grau discreto, detectando-se, em três desses casos, raros exemplares de *Acanthamoeba* sp. Nas sete amostras restantes, não foi encontrada qualquer alteração histopatológica, sendo também, negativas as pesquisas histológicas de *Acanthamoeba* sp. (tabela 4).

TABELA 3

Grau de patogenicidade em camundongos, de 15 amostras de Acanthamoeba sp. isoladas de fezes humanas de 10 indivíduos, segundo meio empregado e temperatura de incubação

ANNE				ANNE — sai	
28 °C		37 °C		37 °C	
N.º de amostra	Grau de patogenicidade	N.º de amostra	Grau de patogenicidade	N.º de amostra	Grau de patogenicidade
7	+	1	+	0	+
1	++	2*	++	2	++
2	—	0	—	1	—

(*) = Uma das amostras é o controle (F415).

(—) = *Acanthamoeba* sp. não reisolada em cérebro, baço ou pulmão (não patogênica).

(+) = Reisolamento de *Acanthamoeba* sp. em cérebro, baço ou pulmão (moderadamente patogênica).

(++) = Morte espontânea de pelo menos um camundongo e reisolamento de *Acanthamoeba* sp. em cérebro, baço ou pulmão (amostra fortemente patogênica).

TABELA 4

Alterações histopatológicas dos cérebros de camundongos nos quais foi reisolada Acanthamoeba sp.

Óbito	N.º de casos	Amebas detectadas no corte histológico	Alterações histopatológicas
Espontâneo	2	++	Meningoencefalite mononuclear com áreas de necrose parenquimatosa
Provocado pelo éter	2	—	Encefalite mononuclear discreta (*)
	3	+	
	2	—	Meningite mononuclear focal e discreta
	3	+	
	7	—	Sem alterações histopatológicas
Total	19		

(*) Um caso apresentou padrão granulomatoso.

(—) Amebas ausentes.

(+) Raras amebas.

(++) Número moderado de amebas.

DISCUSSÃO

Segundo VISVESVARA¹², infecções inaparentes por amebas de vida livre podem ocorrer na natureza, fato confirmado por Kenney, que demonstrou a correlação entre o encontro destes amebídeos nas fezes e a elevação de anticorpos específicos. De acordo com os nossos resultados, foi possível constatar que os amebídeos de vida livre patogênicos estavam sendo albergados por indivíduos aparentemente saudáveis.

A temperatura mais eficiente para o isolamento de amebas de vida livre, a partir de fezes humanas, foi 28 °C. Este dado diverge do relatado por MOURA *et alii*⁶ que, no Rio de Janeiro, consideraram 37 °C a temperatura ideal. Esta diferença pode ser atribuída à prévia adaptação dos amebídeos à temperatura ambiente de cada localidade. Conforme obtivemos de relatório de 1983 do Ministério da Agricultura, a temperatura média anual da cidade de São Paulo foi, no mesmo ano, 19,9 °C (máxima 32,8 °C), enquanto que na cidade do Rio de Janeiro atingiu a média de 27,7 °C (máxima 37,4 °C). Todavia, mesmo em nosso estudo, as amostras mais patogênicas para camundongos foram aquelas isoladas à temperatura de 37 °C.

A temperatura de incubação de 28 °C para o reisolamento das amebas, a partir da retrocultura, foi a que se mostrou mais eficiente (tabela 2).

O cérebro foi o órgão de eleição para a proliferação das amebas, conforme seria de esperar, seguido pelo pulmão e, em último lugar, pelo baço no qual tão-somente nos animais que morreram espontaneamente foi possível o reisolamento dos amebídeos.

O exame anatomopatológico veio corroborar os achados biológicos, predominando nestas infecções os exsudatos inflamatórios de

padrão mononuclear, especialmente às custas de linfócitos e macrófagos, por vezes com esboços granulomatosos. Em plena correlação com a evolução clínica dos animais, as amostras que apresentaram maior patogenicidade, especialmente as que levaram a óbito os camundongos, condicionaram também as principais alterações teciduais, incluindo padrão inflamatório e, até, focos de necrose parenquimatosa. O encontro de *Acanthamoeba* sp. nos cortes teciduais foi também mais frequente e mais intenso nas amostras de maior patogenicidade.

Quinze dos trinta animais inoculados com cepas de *Acanthamoeba* sp. demonstraram retrocultura positiva única e exclusivamente no cérebro. Este fato nos leva a crer que ocorra penetração por contigüidade, e instalação primária no sistema nervoso central, corroborando o achado de PATRAS & ANDUJAR que, em 1966, estudaram um caso onde a penetração de *Acanthamoeba* sp. ocorreu através do alvéolo dentário, após extração de um dente da arcada superior, concordando este relato com o de GRIFFIN² que faz referência a um caso descrito em que a via de penetração foi através do nervo óptico. Esses dados são contrários à hipótese de disseminação por via hematogênica, com posterior localização no sistema nervoso central, defendida por MARTÍNEZ *et alii*⁵.

Com relação à nossa amostra 402, isolada a 37 °C, mista de *Acanthamoeba* sp. e *Naegleria* sp., é possível que tenha ocorrido sinergismo de patogenicidade. GRIFFIN², ao se referir ao trabalho de Appley (1970), também havia levantado esta hipótese. Neste sentido, nossos dados são, ainda, preliminares, e este aspecto será motivo de um próximo estudo onde testaremos separadamente a patogenicidade das cepas de *Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.

RIALA6/575

VELLOSA, S. A. G.; SCHLODTMANN, A. G.; ALVES, V. A. F. & MANGINI, A. C. S. — Free-living amebas (*Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.) in human feces: pathogenicity for mice. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):67-72, 1984.

ABSTRACT: Fifteen samples of *Acanthamoeba* sp., one sample of *Naegleria* sp. and 2 samples of a mixture of *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria* sp. were inoculated to 10-12 g white mice, each sample to a lot of 5 mice. The free-living amebas had been isolated from the stools of individuals from a nursery of São Paulo City. Under slight ether anesthesia, the mice received, through the nasal route, 0.04 ml of a suspension of amebas at concentrations of 3×10^5 to 8×10^6 trophozoites per ml. Six mice died spontaneously and the remaining were sacrificed after observation for 30 days. The brain, spleen and lung were ground and inoculated on Petri dishes with non-nutrient agar or non-nutrient agar with saline layered with heat-killed *Aerobacter aerogenes*. The plates were then incubated at 28 and 37 °C and observed for 10 days. The pathogenicity for mice was disclosed in 4 strains of *Acanthamoeba* sp. and in one sample of the mixture of *Acanthamoeba* sp. and *Naegleria* sp. Sections of some specimens of mouse tissues were microscopically examined and revealed inflammatory changes with predominance of lymphocytes, plasma cells and histiocytes. In some foci, amebas were present.

DESCRIPTORS: free-living amebas, isolation from human feces; *Acanthamoeba* sp., *Naegleria* sp., pathogenicity for mice (experimental study).

VELLOSA, S. A. G.; SCHLODTMANN, A. G.; ALVES, V. A. F. & MANGINI, A. C. S. — Amebas de vida livre (*Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.) isoladas de fezes humanas: patogenicidade para camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1): 67-72, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, K. & JAMIESON, A. — Bacterial suspensions for the growth of *Naegleria* species. *Pathology*, 6:79-84, 1974.
2. GRIFFIN, J. L. — Pathogenic free-living amoebae. In: KREIER, J. P., ed. — *Parasitic protozoa*. v. 2: *Intestinal flagellates, histomonads, trichomonads, amoeba, opalinids, and ciliates*. New York, Academic press., 1978. p. 507-49.
3. MARTINEZ, A. J.; NELSON, E. C. & DUMA, R. J. — Animal model: primary amebic (*Naegleria*) meningoencephalitis in mice. *Am. J. Pathol.*, 73:545-8, 1973.
4. MARTINEZ, A. J.; SANTOS NETO, J. G.; NELSON, E. C.; STAMM, W. P. & WILLAERT, E. — Primary amebic meningoencephalitis. *Pathol. Annu.*, 12:225-50, 1977.
5. MARTINEZ, A. J. — Free-living amoebae: pathogenic aspects. A review. *Protozool. Abstr.*, 7:293-306, 1983.
6. MOURA, H.; SALAZAR, H. C.; FERNANDES, O. & LISBOA, D. C. — Isolamento de amebas de vida livre em fezes de indivíduos residentes em comunidade fechada. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19.^o, Rio de Janeiro, 1983. p. 113. [Programas e resumos]
7. PAGE, F. C. — An illustrated key to freshwater and soil amoebae. With notes on cultivation and ecology. [s.l.] Freshwater Biological Assoc., 976. 155 p. [Sci. publ. n.º 34]
8. PATRAS, D. & ANDUJAR, J. J. — Meningoencephalitis due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). *Amer. J. clin. Path.*, 46:226-33, 1966.
9. SKOCIL, V.; SERBUS, C. & CERVA, L. — Epidemiological study of the incidence of amoebae of the limax group in military communities. III. Investigation of the community of 3rd Carrison LI problems of contagion in the community. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* (Prague), 15:156-62, 1971.
10. SALAZAR, H. C. & MOURA, H. — Pesquisa de anticorpos para *Naegleria* e *Acanthamoeba* em soros humanos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19.^o, Rio de Janeiro, 1983. p. 112. [Programas e Resumos]
11. VELLOSA, S. A. G.; SCHLODTMANN, A. G.; ALVES, V. A. F. & MANGINI, A. C. S. — Amebas de vida livre (*Naegleria* sp. e *Acanthamoeba* sp.) isoladas de fezes humanas: patogenicidade para camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44:61-65, 1984.
12. VISVESVARA, G. S. — The public health importance and disease potencial of small free-living amoebae. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY AND PATHOGENICITY OF SMALL FREE-LIVING AMOEBAE. 2nd. Gainesville, Florida, 1980. p. 28-45. [Report s.n.t.]
13. WILLAERT, E. — The pathogenicity of free-living amoebae. *Rev. Assoc. Belgue Technol. Lab.*, 4:101-22, 1977.

Recebido para publicação em 5 de janeiro de 1984.