ARTÍCULO ORIGINAL

Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile

VÍCTOR MUÑOZ*, HERNÁN REYES**, PAOLA TOCHE**,
CARLOS CÁRCAMO** y BEATRIZ GOTTLIEB***

ISOLATION OF FREE LIVING AMOEBAE FROM PUBLIC SWIMMING POOL IN SANTIAGO, CHILE

*The presence of free living **Amoebae** (FLA) was studied in samples of water obtained from 8 public swimming pool, collected from surface, bottom, channels, and filter. 8 samples for swimming pool, 64 samples in total. **Amoebae** were found in 5 swimming pool (62%). In 22 of the samples the **Amoebae** genus were identified (34.5%). These were *Hartmannella vermiformes* (12.5%); *Vanella* sp. (9.4%); *Naegleria* (7.8) and *Acanthamoeba* (4.7%). Considering the pathogenic capacity to man, the 36.4% of the isolated strains belonged to those that have been proved dangerous (*Naegleria* and *Acanthamoeba*). In summary, this study recomend to be any maintenance more prolix of public swiming pool from Santiago, included filtration sytems or water recirculation, die who clinical aspects to be promote these FLA are reality severes arrived inclusive to death .*

Key words: Free living *Amoebae*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella vermiformes*, *Vannella* sp.

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos que se desarrollan en el ambiente principalmente, en aguas templadas que se mantienen relativamente inmóviles (piscinas, lagunas, estanques). Algunas especies de AVL pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* han sido descritas como potencialmente patógenas para el hombre causando meningoencefalitis amebiana primaria (MAP)¹⁻² y otros cuadros como queratitis grave en el hombre³⁻⁵.

Naegleria fowleri produce un cuadro de encefalitis con elevada mortalidad, que ocurre en

personas jóvenes que tienen generalmente el antecedente de haberse bañado en piscinas o fuentes acuáticas de aguas templadas, la mayoría de las veces se obtiene el antecedente que el paciente se zambulló, lo que provoca entrada brusca de agua en fosas nasales y el posterior paso de los protozoos a través de la lámina cribosa del etmoides⁶⁻⁸.

Las amebas de género *Acanthamoeba* afectan con mayor frecuencia a pacientes inmunocomprometidos, y pueden provocar un cuadro de meningoencefalitis de curso más larvado, precedido de manifestaciones respiratorias sin el antecedente de que el paciente haya estado

* Escuela de Enfermería y Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile Stgo. Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico. Programa Biología Celular y Molecular ICBM.

** Unidad de Parasitología. Facultad de Medicina Campus Oriente Universidad de Chile Stgo.

*** Hospital Luis Calvo Mackenna.

expuesto a aguas presuntamente contaminadas^{9,10}. Además, existen algunas especies de *Acanthamoeba* que suelen causar un cuadro ocular consistente en úlceras corneales de difícil manejo y ocurre principalmente en usuarios de lentes de contacto, siendo la mayoría de las veces la fuente de infección la mala conservación, almacenamiento y limpieza de dichos lentes.

En Chile, existen todas las condiciones epidemiológicas para que se desarrollen AVL sin problemas. A partir de 1993, estudios han demostrado la presencia de 92% de positividad para AVL en reservorios de agua dulce naturales de sectores urbanos, semi-urbanos y rurales de cinco regiones de Chile¹¹. De las AVL encontradas el 31% correspondieron a *Acanthamoeba* sp. y 7,6% a *Naegleria* sp., consideradas ambas pertenecientes a las denominadas Amebas de Vida Libre potencialmente patógenas para el hombre (AVLPP).

Debido a la gran frecuencia de AVL encontradas en hábitat de aguas dulces en Chile, se planteó el presente trabajo de investigación, consistente en verificar la presencia AVL en piscinas públicas de Santiago.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se efectuó en ocho piscinas públicas de Santiago durante el periodo estival, las cuales se identificaron por los numerales I a VIII.

De cada una se tomó 8 muestras de agua, 800 - 1.000 ml, con matraces estériles (dos desde la superficie, dos a 30 cm de profundidad, dos desde el fondo, una en la canaleta lateral de desagüe y una a la salida del filtro), las cuales se sellaron y rotularon convenientemente. Las muestras fueron tomadas en horas de atención a público.

El análisis de estas muestras fue efectuado con dos métodos: mediante examen directo a fresco y por cultivo. El directo a fresco tenía un objetivo de orientación sobre la posible presencia de AVL, y el cultivo para confirmación y aislamiento. Para ello primero se las dejó decantar por tres a cuatro horas en matraces de copa, estériles, protegido del polvo para evitar contaminación exógena. Desechado el sobrenadante, se centrifugó el sedimento a baja velocidad (1.000 r.p.m.). Del centrifugado se realizó el examen directo a fresco, entre lámina y laminilla y se obtuvo los inóculos para la siembra

del cultivo. La lectura directa (4 preparados por muestra) fue hecha tanto con microscopio óptico corriente, como de contraste de fase, a aumentos de 10x y 40x.

Para la siembra, se dejó caer dos gotas del sedimento respectivo en cuatro placas de Petri preparadas con medio de agar no nutritivo (ANNE) en cuya superficie se depositó previamente una película de *Escherichia coli* inactivadas, con la finalidad de servir como nutrientes para las AVL¹². Todo este procedimiento inicial fue efectuado en un lapso no mayor de 72 horas desde la recolección de la muestra.

Dos de las placas fueron incubadas a 37°C y otras dos a 42°C, durante siete días, examinándolas cada 24 horas bajo microscopio corriente y lupa esteroscópica¹².

Si a los siete días de observación no hubo multiplicación de AVL, la muestra fue considerada negativa. Si, en cambio, existió desarrollo, se procedió al aislamiento de las colonias. Para ello, bajo lupa esteroscópica, con bisturí fino y esterilizado, se cortó trozos de agar conteniendo las colonias y se los traspasó a otras placas preparadas en la forma ya mencionada. Se repitió todo este mismo proceso durante el plazo necesario hasta obtener cepas puras o clonadas, siendo éste de 30 - 35 días.

Una vez logrado lo anterior, se procedió a estudiar las características morfológicas de los trofozoitos y/o quistes, con el objetivo de diagnosticar el género y/o la especie.

La identificación genérica se basó en los parámetros descritos¹². En los casos de diferenciación entre trofozoitos de *Hartmannella* y *Naegleria*, de gran semejanza morfológica, se recurrió a un método preconizado, para la demostración de la forma flagelada de las *Naegleria*¹³.

RESULTADOS

Se analizó un total de 64 muestras (8 tomas por piscina). El examen directo y por cultivo de las muestras recolectadas de las piscinas IV, V y VIII, resultaron negativas, mientras que las muestras de agua de las piscinas restantes se observaron algunas AVL.

En relación a los cultivos en medio ANNE, de las 64 muestras obtenidas de distintos sitios de las 8 piscinas estudiadas, 14 muestras fueron

Tabla 1. Número de muestras con cultivo positivo a Amebas de Vida Libre en 5 de 8 piscinas públicas de Santiago, Chile

Sitio de Muestras	I	II	III	VI	VII	Total	
						Nº	%
Superficie				2		2	14,3
30 cm profundidad				2		2	14,3
Fondo	2	2	1			5	35,7
Canaleta		1	1	1	1	4	28,6
Filtro		1				1	7,1
Total	2	4	2	5	1	14	100,0

Tabla 2. Número y porcentaje de 22 cepas de Amibas de Vida Libre encontradas en 64 muestras de agua de 8 piscinas públicas, Santiago, Chile

AVL	Cepas	
	Nº	%
<i>Hartmannella vermiformes</i>	8	12,5
<i>Vannella</i> sp.	6	9,4
<i>Naegleria</i> sp.	5	7,8
<i>Acanthamoeba</i> sp.	3	4,7

positivas, con desarrollo de AVL. En 6 cultivos positivos hubo multiplicación de más de un género de AVL (correspondiente a las piscinas II, III, VI y VII). La piscina VI, fue la que arrojó mayor cantidad de muestras positivas: de 8 muestras recolectadas, en 5 existió crecimiento de una o más AVL. Las muestras positivas se concentraron en las canaletas y en el fondo de las piscinas II, III, VI y VII, donde hubo desarrollo de AVL. (Tabla 1).

Con respecto a la distribución por especies pesquiasadas de 64 muestras de agua recolectadas de las 8 piscinas (Tabla 2), *Hartmannella vermiforme* fue la de mayor frecuencia con un 12,5% (8 casos), le sigue en orden decreciente *Vannella* sp., con 9,4% (6 casos), *Naegleria* sp.

con el 7,8% (5 casos) y *Acanthamoeba* con el 4,7% (3 casos).

Dentro de las amebas de vida libre potencialmente patógenas (AVLPP), la que se encontró en mayor número fue *Naegleria* con un 7,8% (5 casos), mientras que la *Acanthamoeba* arrojó un porcentaje de 4,7% (3 casos), al contrario de la generalidad escrita por la literatura.

Por otra parte, de un total de 22 cepas clonadas obtenidas de las 8 piscinas, hubo desarrollo en orden decreciente de *H. vermiformes*, 8 cepas (36,4%); de *Vannella* sp., 6 cepas (27,3%), de *Naegleria*, 5 cepas (22,7%) y de *Acanthamoeba*, 3 cepas (13,6%). (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La observación microscópica de muestras de aguas de piscinas, presenta numerosos microorganismos, entre ellos, muchos protozoos ciliados, flagelados y ácaros en algunas ocasiones. El papel patogénico de estos aún es especulativo.

Sí es importante la presencia de AVL en aguas de piscinas, tal como las publicaciones actuales mencionan. La importancia epidemiológica de esta fuente no natural de las AVL, consiste en la

Tabla 3. Número de cepas de Amebas de Vida Libre (AVL) aisladas por clonaje en cultivo en 5 de 8 piscinas públicas de Santiago, Chile

AVL	I	II	III	VI	VII	Total	
						Nº	%
<i>Hartmannella vermiformes</i>		2		5	1	8	36,4
<i>Vannella</i> sp.	2		2	1	1	6	27,3
<i>Naegleria</i> sp.		1	1	2	1	5	22,7
<i>Acanthamoeba</i> sp.		2	1			3	13,6
Total	2	5	4	8	3	22	100,0

Figura 1. Toma de muestra de Canaleta (D_1).

Figura 2.-Trofozoitos de *Acanthamoeba* en medio ANNE (Estereoscopio, aumento 10x).

Figura 3. Trofozoitos de *Acanthamoeba* en en medio ANNE (estereoscopio, aumento 40x).

Figura 4. Quistes de *Naegleria* (microscopio, aumento 40x).

potencialidad de servir como vehículo en la transmisión de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP).

Investigadores reseñaron que quistes de AVL usualmente llegaban a las aguas de las piscinas por el aire¹⁴, mientras que otros describían que las AVL, llegaban por las aguas que abastecían las piscinas^{15, 16}. A simple vista, son fuentes de AVL muy difícil de controlar. Esta situación hace más importante estudiar la presencia de AVL y determinar las especies existentes, para tomar las precauciones pertinentes y eliminar o disminuir esta flora que puede llegar a ser letal en el ser humano.

En nuestra investigación, AVL fueron aisladas

de 5 piscinas de las 8 estudiadas (62 %), cantidad que las autoridades de Salud o Municipales deberían tomar en cuenta e inspeccionar con más rigurosidad la mantención de estos lugares acuáticos de uso público.

En la piscina VI, en 5 puntos de recolección, el cultivo y el examen directo resultaron positivos a AVL, siendo la más contaminada que el resto. Esto se debería a factores, tales como: abastecida por agua de riego proveniente de la cordillera; se encuentra rodeada de árboles; no tiene cubierta o techo que proteja del aire, viento, caída de ramas o insectos, entre otros.

Los sitios donde se concentró la mayor cantidad de muestras positivas a AVL en las

piscinas, fueron las aguas que se recolectaron de las canaletas (rebalse), sitios que a simple vista destacan por ser uno de los más descuidados en cuanto a aseo, dado que generalmente contienen desperdicios y residuos, siendo estos puntos ricos en materia orgánica con poco movimiento en donde se concentra una gran población de AVL, hongos y bacterias.

A pesar que sólo de la piscina II se aisló AVL de la salida del filtro, esto reafirma el concepto que el sistema de filtración de las aguas, tiene que ver mucho con la cantidad y variedad de seres microscópicos en las piscinas. Todas las piscinas estudiadas, poseen el sistema de arena para la filtración o recirculación de las aguas, que en la práctica son verdaderos caldo de cultivo para las Amebas, por la gran cantidad de partículas orgánicas retenidas, perpetuando así la presencia de éstas en las aguas de la piscina. Basados en estos antecedentes, se recomienda a la administración de estos lugares públicos, efectuar cambios de sus filtros en forma más seguida o bien, cambiar el sistema.

Respecto de los agentes desinfectantes como cloro, bromo y antifúngicos que se utilizan, son muy eficaces para disminuir la flora bacteriana y micótica¹⁷, pero no existe claridad en la literatura sobre su eficacia en la población amebiana, lo que fue corroborado por nuestra casuística, ya que en 7 piscinas se utilizaba cloro a una concentración adecuada de acuerdo a lo exigido en nuestro país y en 5 de ellas se aisló AVL de las aguas.

La piscina V, donde el examen directo y cultivo fueron totalmente negativos, sin encontrar desarrollo de ningún ser vivo microscópico, usaban cloro en concentraciones tan altas que hacía irrespirable el medio ambiente, incluso con malestares oculares por estar techada y existía muy poco movimiento de aire, lo que puede traer consecuencias en la salud de los bañistas. La literatura indica que existe una concentración inicial de cloro que destruye quistes de amebas, pero no así el residual¹⁸.

Asimismo, consideramos de gran importancia el aislamiento de *Naegleria* (7,8%) en 5 sitios de recolección y de *Acanthamoeba* (4,7%) en 3 sitios (Tabla 2).

Como es sabido, dentro de estos dos grupos de AVL pesquisados, se encuentran especies catalogadas como patógenas y han sido aisladas de numerosos cuadros meníngeos: *Naegleria*

fowleri; *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba culbertsoni*; *Acanthamoeba castellani*. Al no contar con sueros tipificadores, las especies clonadas y cultivadas se guardaron en medio ANNE, para su posterior inoculación experimental y determinar su acción patogénica.

La distribución de las AVL en el interior de las piscinas, no es homogénea y la localización depende de numerosos factores: biología del parásito, tipo de recirculación del agua en la piscina, material utilizado en su construcción, tipos de recirculación del agua, tipos de desinfectantes, frecuencia de bañistas, el tiempo de uso de la piscina, acúmulo de sustancias orgánicas, conceptos con los cuales estamos totalmente de acuerdo, excepto que nuestra investigación del total de 22 cepas aisladas nuestra mayor frecuencia fue de *Naegleria* (22,7%) y de *Acanthamoeba* (13,6%), que es a la inversa de lo descrito por este autor¹⁹.

RESUMEN

La presencia de amebas de vida libre (AVL) se estudio en muestras de agua obtenidas de 8 piscinas públicas. La recolección de la superficie, fondo, canales y filtros. Ocho muestras de cada piscina, con un total de 64. La amebas fueron encontradas en 5 piscinas (62%). En 22 de las muestras cepas de amebas se identificaron (34, 5%). De estas *Hartmannella vermiformes* constituyo el 12,5%; *Vannella* sp., 9,4%; *Naegleria*, 7,8% y *Acanthamoeba* un 4,7%. Considerando la capacidad patógena para el hombre, el 36,6% de las cepas aisladas resultarían ser que tienen probado peligro (*Naegleria* y *Acanthamoeba*).

En consecuencia, este trabajo recomienda hacer un mantenimiento más prolijo de las piscinas públicas de Santiago, incluyendo los sistemas de filtración o recirculación de las aguas utilizadas, dado que los cuadros clínicos que pueden provocar estas AVL son realmente severos llegando incluso a causar la muerte.

REFERENCIAS

- 1.- CERVA L, NOVACK K. Amebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. Science 1968; 160: 192.
- 2.- SZENASI Z, ENDOT, YAGITA K, NAGYE E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. J Med Microbiol 1998 Jan; 47: 5-16.

- 3.- PARIJA S C, PRAKASH M R, RAO V A, VELLANIPARAMBIL R J. *Acanthamoeba* keratitis in Pondicherry. J Commun Dis 2001 Jun; 33: 126-9.
- 4.- NIEDERKORN J Y, ALIZADEH H, LEHER H, McCULLEY J P. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. Microbes Infect 1999 May; 1: 437-43.
- 5.- MUÑOZ V, DONOSO R. Evaluación de la toma de muestra en pacientes con diagnóstico presuntivo de Queratitis por *Acanthamoeba*. Rev Chil Tecnol Med 2001; 21: 968.
- 6.- VISVESVARA G S, STEHR-GREEN J K. Epidemiology of free-living ameba infections. J Protozool 1990 Jul-Aug; 37: 25S-33S.
- 7.- SHENOY S, WILSON G, PRASHANTH H V et al. Primary Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: First reported cases from Mangalore, South India. J Clin Microbiol 2002 Jan; 40: 309-10.
- 8.- SEAGLIA M. Human pathology caused by free-living amoebae. Ann Ist Super Sanita 1997; 33: 551-66.
- 9.- VISVESVARA G S, BALAMUNTH W. Comparative studies on related free-living an pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba* J Protozool 1975; 22: 245-56.
- 10.- GOTTLIEB B. Meningoencephalitis amebiana primaria. Cap 33, en Parasitología Clínica de Atías-Neghme, tercera edición Mediterráneo Ltda. Santiago de Chile 1991.
- 11.- MUÑOZ V, REYES H, ASTORGA B et al. Amebas de Vida Libre en habitats de aguas dulces de Chile. Parasitol al Día 1993; 17: 147-52.
- 12.- PAGE W C. An illustrated key to freshwater and soil amoebae, with notes on cultivation and ecology. Fresh Boil Ass Sci Publ 1976; 34: 1-155.
- 13.- MOLET B, KREMER M. Techniques d'études et criteres morphologiques pour l' identification des amibes libres. Bull Soc Sci Vet Med Comp Lyon 1976; 78: 215-24.
- 14.- KINGSTON D C, WARHURST D. Isolation of amoebae from the air. J Med Microbiol 1969; 2: 27-36.
- 15.- JADIN J, WILLIAERT E, COMPERE F. De la nécessité du contrôle biologique des eaux potables. Bull Acad Not Med 1972; 156: 995-9.
- 16.- HOFFMANN R, MICHEL R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation supply of drinking water. Inst J Hyg Environ Health. 2001 Mar; 203: 215-9.
- 17.- BROWN J G, PORTER P A. Chlorination-ph test conducted to show pool bacteria control swimming pool. Weethly Swimming Pool Age 1972; 46: 58-60.
- 18.- DE FONCKHERERE J, VAN DE VOORDE. Differences in destruction of cyst of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine apl. Environ Microbiol 1979; 31: 294-7.
- 19.- MOURA. Amebas de Vida Libre en Piscinas. Isolamento, Identificación, Potencial Patogénico. Instituto Osvaldo Cruz 1980; 39-40.

Agradecimientos: Deseo expresar mis agradecimientos al T.M: Juan Carlos Araya, editor de la Revista Chilena de Tecnología Médica, por su valiosa colaboración en la producción de este manuscrito.

ANNOUNCEMENT

PARASITOLOGIA LATINOAMERICANA IN INTERNET

Information about Parasitología Latinoamericana and its electronic version can be found in: www.scielo.cl