

AMEBAS DE VIDA LIVRE NO INTESTINO HUMANO EVIDÊNCIAS DE PARASITISMO

Hércules de MOURA (1), Homero Coutinho SALAZAR (2), Octavio FERNANDES (3), Denise Costa LISBOA (4) e Francisca Gonçalves de CARVALHO (5)

R E S U M O

Foram cultivadas fezes de 620 indivíduos para a pesquisa de amebas de vida livre, sendo 514 pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ) e 106 crianças e adultos de um orfanato. Foram positivas 70 amostras (11,2%) sendo 55 provenientes de pacientes do HU-UERJ e 15 de internos do orfanato. Foram isoladas 60 amostras de *Acanthamoeba*, 6 de *Vahlkampfia*, 5 de *Hartmannella* e 1 *Echinamoeba*. Alguns indivíduos tiveram cultura de fezes repetidamente positiva para *Acanthamoeba* durante dois meses de observação. Das amostras de *Acanthamoeba* isoladas, 28 foram inoculadas em camundongos por via intranasal, tendo sido reisoladas 16 (57,1%) amostras à partir de cérebro e (ou) pulmões dos animais. O estudo histopatológico demonstrou processo inflamatório agudo com presença de polimorfonucleares e amebas no cérebro e pulmões de alguns animais. O encontro de amostras patogênicas em fezes humanas reforça a hipótese do eventual desenvolvimento, em indivíduos portadores, de meningoencefalite amebiana granulomatosa, como infecção oportunística de origem endógena.

I N T R O D U Ç Ã O

A hipótese de que as amebas de vida livre (AVL) fossem agentes de infecção para o homem e animais foi primeiramente aventada por CULBERTSON & col.^{4,5}. Posteriormente FOWLER & CARTER⁷ e BUTT¹ descreveram os primeiros casos de Meningoencefalite Amebiana Primária (MEAP).

Hoje sabemos que as amebas dos gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba* são agentes infecciosos para o homem, a primeira causando meningoencefalite aguda e quase sempre fatal, e a segunda quadros diversos, como pneumonias, dermatites, úlceras de córnea, além de meningoencefalite granulomatosa (MEG)¹².

Tais protozoários são comumente encontrados em diversos tipos de coleções de água em todo o mundo, e, no Brasil, têm sido isoladas a partir de água mineral, de chafarizes, lagos, piscinas e da rede de distribuição urbana do Rio de Janeiro^{10,16,19}.

A determinação da patogenicidade de amostras de AVL, isoladas a partir de material biológico ou de ambiente, é assunto controverso devido aos diferentes critérios adotados^{2,6,13}, mas, após instilação nasal em camundongos, o acesso dos protozoários ao sistema nervoso central ocorre através do nervo olfativo ou ain-

Trabalho realizado na Disciplina de Parasitologia, Departamento de Patologia e Laboratórios da Faculdade de Ciências Médicas — Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Financiado em parte pela FINEP — Processo n.º 4382/0270-00

- (1) Professor Auxiliar — Disciplina de Parasitologia. Faculdade de Ciências Médicas — UERJ, Brasil
- (2) Professor Adjunto — Responsável pela Disciplina de Parasitologia — Faculdade de Ciências Médicas — UERJ
- (3) Acadêmico de Medicina — Estagiário — Disciplina de Parasitologia — Faculdade de Ciências Médicas — UERJ
- (4) Bióloga — Estagiária — Disciplina de Parasitologia — Faculdade de Ciências Médicas — UERJ
- (5) Médica — Hospital dos Servidores do Estado (INAMPS) e Hospital do IASERJ

da por disseminação hematogênica a partir de foco pneumônico¹³.

O encontro das amebas de vida livre em fezes humanas vem sendo assinalado desde o início do século¹⁸, mas desde que SCHAUD-DINN estabeleceu que a única ameba patogênica para o homem seria *Entamoeba histolytica*, tais achados foram interpretados como casos de pseudoparasitismo.

O objetivo do presente trabalho é relatar o isolamento de AVL a partir de fezes de dois grupos estudados no Rio de Janeiro, assinalar a eliminação intermitente dos protozoários por alguns indivíduos acompanhados durante dois meses após o primeiro isolamento, bem como relatar os estudos feitos, com algumas amostras isoladas, para a demonstração da patogenicidade para animais de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram cultivadas fezes de 514 pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ), sendo a amostragem feita por sorteio à partir de material recebido para diagnóstico. Os outros indivíduos pesquisados eram internos e funcionários de um orfanato localizado na zona norte do Rio de Janeiro, em que foram colhidas as fezes de 86 crianças e de 20 adultos. Os indivíduos positivos do orfanato tiveram suas fezes cultivadas por mais três vezes, a cada 15 dias. Cerca de 2g de fezes foram diluídas em água destilada esterilizada e colocadas em placas de Petri contendo ágar não nutriente e recobertas com tapetes de suspensão de *Aerobacter aerogenes* morto pelo calor (ANNA). As placas foram incubadas às temperaturas de 37°C, 40°C e 45°C e no 5.º e 10.º dias foram invertidas e observadas em microscópio comum. Para o isolamento e identificação das amostras foi utilizada a metodologia de MOLET & KREMER¹⁵, PAGE¹⁷ e MOURA¹⁶.

Foram realizados testes de patogenicidade com algumas amostras de *Acanthamoeba* isoladas. Cada uma das amostras testadas, após crescimento em meio ANNA, durante 24 a 36 horas a 37°C, foi recolhida e concentrada por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos, tendo sido a concentração final de suspensão ajustada entre 10⁴ e 10⁶ trofozoítos por mililitro.

Foram utilizados camundongos albinos "out-bred" pesando entre 10 e 15 gramas. Os animais, em grupos de 5, foram inoculados por via intranasal com 0,02 a 0,04ml de suspensão de amebas e observados por 30 dias. Após a morte ou sacrifício dos animais, fragmento de cérebro e pulmões foram retirados e colocados em placas com ANNA, incubados a 37°C e observados até o 10.º dia.

Para estudo anátomo-patológico os órgãos foram fixados em PBS — formol a 10%, incluídos em parafina, clivados e corados com Hematoxilina-Eosina.

RESULTADOS

Na Tabela I observamos que 10% das fezes provenientes de pacientes do HU-UERJ foram positivas para amebas de vida livre dos gêneros *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* e *Vahlkampfia* e que 52% das amostras de *Acanthamoeba*, quando inoculadas em camundongos, foram reisoladas de seus órgãos, enquanto que 14% dos indivíduos do orfanato tiveram suas fezes positivas para *Acanthamoeba*, *Hartmannella* e *Vahlkampfia*.

Quanto as amostras provenientes dos indivíduos do orfanato foram cultivadas outras três vezes foi observado o isolamento de *Acanthamoeba* (Figs. 1 e 2) na segunda amostra de dois indivíduos. Seis indivíduos, inclusive aqueles positivos na segunda amostra, apresentaram positividade na terceira, enquanto que na quarta amostra apenas dois continuaram eliminando o protozoário.

Apesar de não ter sido proposto neste estudo, em nenhum momento foram observados, nos indivíduos estudados, episódios sugestivos de doença intestinal por estes protozoários.

Na Tabela II estão relacionadas as amostras de *Acanthamoeba* inoculadas em camundongos, o tempo de sobrevivência dos animais após a inoculação e os órgãos de onde os protozoários foram reisolados. Das 19 amostras isoladas de fezes de pacientes do HU-UERJ, quatro foram reisoladas somente a partir dos pulmões, uma somente a partir de cérebro e cinco foram reisoladas de cérebro e pulmões. A sobrevivência dos animais foi bastante variada, sendo que a amostra F 401 causou a morte de todos ainda na primeira semana após a inoculação.

TABELA I

Origem das amostras pesquisadas, gêneros de amebas de vida livre isoladas e testes de patogenicidade

Origem das amostras	N.º de amostras pesquisadas	Amostras positivas		Gêneros n.º de amostras isoladas	N.º de amostras de <i>Acanthamoeba</i> sp inoculadas em camundongo	Amostras reisoladas de cérebro e/ou pulmão	
		N.º	(%)			N.º	(%)
Pacientes do HC UERJ	514	55	10,7	<i>Acanthamoeba</i> sp	19	10	52,6
				51			
				<i>Echinamoeba</i> sp			
				1			
<i>Vahlkampfia</i> sp	3						
3							
Crianças e adultos do orfanato	106	15	14,1	<i>Acanthamoeba</i> sp	9	6	66,6
				9			
				<i>Hartmannella</i> sp			
				5			
<i>Vahlkampfia</i> sp	3						
3							
Total	620	70	11,2	<i>Acanthamoeba</i> sp	28	16	57,1
				60			
				<i>Echinamoeba</i> sp			
				1			
				<i>Hartmannella</i> sp			
				5			
				<i>Vahlkampfia</i> sp			
				6			



Fig. 1 — Trofozoito de *Acanthamoeba* sp. Notar acantopódios contraste de fase. 1000 X

Todas as amostras de *Acanthamoeba* isoladas de indivíduos do orfanato foram inoculadas e destas, seis foram reisoladas concomitantemente de cérebro e pulmões e os animais inoculados com quatro delas morreram a partir da primeira semana de infecção.

O estudo histopatológico realizado no cérebro e pulmões de alguns animais de cujos ór-

gãos houve reisolamento de *Acanthamoeba* em cultura, demonstrou reação inflamatória comprometendo o parênquima, com presença de infiltrado inflamatório predominantemente de leucócitos polimorfonucleares e amebas. Nas Figs. 3 e 4 observamos cortes de tecido cerebral e pulmonar de camundongo inoculado com

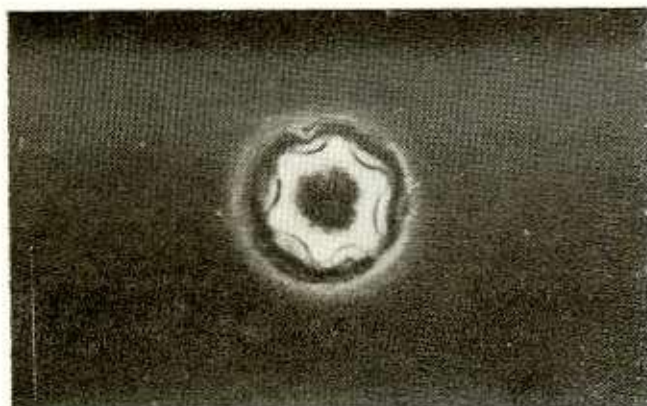


Fig. 2 — Cisto de *Acanthamoeba* sp (grupo II)
— Contraste de fase: 400 X

T A B E L A II

Amostras de *Acanthamoeba* sp inoculadas em camundongo albino, tempo de vida pós-inoculação e reisolamento em cultura

Origem das amostras	Amostras inoculadas	Morte (n.º de dias pós-inóculo)					N.º de animais positivos em	
							Pulmão	Cérebro
HC — UERJ	F 205 — 241 — 243 — 244	30(+)	30	30	30	30	0	0
	253 — 283 — 303 — 320							
	345							
	F 3							
	F 237							
	F 254							
	F 267							
	F 294							
	F 315							
	F 363							
	F 376							
	F 401							
F 529								
Orfanato	F 433 — 466 — 470	30	30	30	30	30	0	0
	F 408	4	4	30	30	30	2	2
	F 411	30	30	30	30	30	1	1
	F 421	6	14	14	30	30	1	1
	F 442	30	30	30	30	30	1	1
	F 475	4	4	8	16	18	2	2
	F 486	4	9	9	30	30	1	1

(+) — Todos que sobreviveram até o 30.º dia foram sacrificados.

a amostra F 529 e que morreu no 12.º dia de infecção.

DISCUSSÃO

Amebas de vida livre tem sido observadas e isoladas a partir de fezes humanas sendo *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* e *Vahlkampfia* os gêneros mais frequentemente isolados^{3,8,9,14,18}.

Em estudo realizado com estudantes universitários de diversas regiões da Costa Rica, CHINCHILLA & col.³ relataram positividade para amebas de vida livre de 8,2% das amostras examinadas. Nos dois grupos que estuda-

mos obtivemos 10% e 14% de positividade, sendo encontrada maior prevalência na população de comunidade fechada.

O encontro destes protozoários em fezes pode ser interpretado de diferentes maneiras. Eles podem ter sido ingeridos acidentalmente, pois estão presentes em águas de abastecimento, água mineral e até alimentos^{8,10,19} e serem eliminados sob a forma cística. A colonização do orofaringe ou do tubo digestivo destes indivíduos, é outra hipótese a ser considerada. Nestes casos os protozoários se desencistariam e se multiplicariam naqueles locais e, ao che-

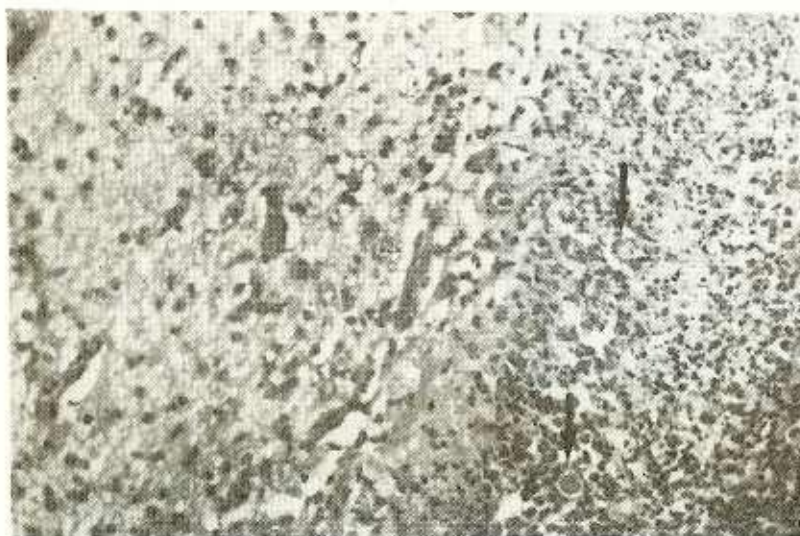


Fig. 3 — Cérebro. Corte histológico mostrando parênquima cerebral reacional (esquerda) e área de abscesso contendo células inflamatórias, material necrótico e trofozoítos de *Acanthamoeba* sp (setas)



Fig. 4 — Pulmão. Área de abscesso contendo material necrótico, células inflamatórias e numerosos trofozoítos de *Acanthamoeba* sp (setas)

garem ao ambiente, cumpririam parte do seu ciclo biológico.

No presente estudo, os testes de patogenicidade realizados com as amostras de *Acanthamoeba* cultivadas a partir de fezes humanas, demonstraram que 57,1% das mesmas foram reisoladas a partir de cérebro e(ou) pulmões de camundongos inoculados por via intranasal.

A inoculação intranasal de suspensões de trofozoítos de amebas de vida livre em camundongos é sujeita a muitas variáveis⁶, pois é influenciada por fatores do hospedeiro, como a espécie, idade, sexo e, por fatores do parasito, como a virulência da amostra, fase do cres-

cimento em cultura e número de amebas no inóculo. Apesar destas limitações, é a via que melhor imita as condições de infecção reconhecidas até o momento.

De acordo com este critério, foram consideradas patogênicas as amostras reisoladas a partir dos tecidos dos animais inoculados, o que é expressivo indicador da patogenicidade das mesmas, pois observamos que os animais submetidos a exame histopatológico apresentaram processo broncopneumônico e meningoencefalite aguda.

As implicações destes dados do ponto de vista da nosologia humana são discutíveis e devem

ser avaliados com cautela. A hipótese de pseudo-parasitismo deve ser considerada, mas não podemos deixar de valorizar o achado de culturas de fezes positivas para *Acanthamoeba* em alguns indivíduos por duas e até três vezes no intervalo de dois meses.

Tais achados, aliados aos da literatura 8,11, 12,14 nos levam à suposição de que as amebas isoladas sejam, na realidade, habitantes do tubo digestivo com capacidade de, em determinadas condições, invadir os tecidos do hospedeiro, o que encontra respaldo nos resultados dos testes de patogenicidade realizados em camundongos.

O encontro de amebas de vida livre patogênicas em fezes humanas reforça a hipótese de eventual desenvolvimento, em indivíduos portadores, de infecções extra-intestinais de origem endógena, como a meningoencefalite granulomatosa.

SUMMARY

Free-living amoebae in human bowel: Evidence of parasitism

Cultures for free-living amoebae were made from feces of 620 individuals of which 514 were patients from the University Hospital Pedro Ernesto (Rio de Janeiro) and, 106 were children and adults of an orphanage.

Positive results were obtained in 70 specimens (11.2%), 55 from the hospital patients and 15 from the orphanage. 60 *Acanthamoeba*, 6 *Vahlkampfia*, 5 *Hartmannella* and, 1 *Echinamoeba* were isolated.

Some individuals were repeatedly positive for *Acanthamoeba* during the 2 months of observation.

Of the isolated *Acanthamoeba*, 28 were inoculated intranasally. 16 Strains (57.1%) were reisolated from brain and or lungs of the animals. The histopathology revealed an acute inflammatory process with polymorphonuclear neutrophils and amoebae in the brain and lungs of some of the animals.

The isolation of pathogenic strains of *Acanthamoeba* from human feces supports the hypothesis of eventual development, in carriers,

of granulomatous amoebic meningoencephalitis as an opportunistic endogenous infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUTT, C. G. — Primary amoebic meningoencephalitis. *New Engl. J. Med.* 274: 1473-1476, 1966.
2. CERVA, L. — Studies of limax amoebae in swimming pool. *Hydrobiologia* 38: 141-161, 1971.
3. CHINCHILLA, M.; CASTRO, E.; ALFARO, M. & PORTILLA, E. — Amebas de vida livre produtoras de meningoencephalitis. Primeiros hallazgos en Costa Rica. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 21: 135-142. 1979.
4. CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. & MINNER, J. — *Acanthamoeba* observation on animal pathogenicity. *Science* 127: 1506, 1958.
5. CULBERTSON, C. G.; SMITH, J.; COHEN, H. & MINNER, J. — Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Amer. J. Pathol.* 35: 185-197, 1959.
6. DE JONCKHEERE, J. F. — Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 33 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 681-685, 1980.
7. FOWLER, M. & CARTER, R. F. — Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Brit. Med. J.* 2: 740-742, 1965.
8. JADIN, J. B. — De la dispersion et du cycle des amibes libres. *Ann. Soc. belge. Med. Trop.* 54: 371-385, 1974.
9. JADIN, J. B.; WILLAERT, E. & COMPÈRE, F. — De la nécessité du contrôle biologique de eaux potables. *Bull. Acad. Nat. Med.* 156: 995-999, 1972.
10. LISBOA, D. C.; SALAZAR, H. C.; FERNANDES, O. & MOURA, H. — Isolamento de amebas de vida livre em água da rede urbana na cidade do Rio de Janeiro. In: *Congresso da Federación Latino americana de Parasitólogos.* 6.º, São Paulo, 1983. Resumos. São Paulo, 1983, p. 35.
11. MARTINEZ, A. J. — *Acanthamoebiasis* and Immunosuppression. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 41: 548-557, 1982.
12. MARTINEZ, A. J. & DE JONCKHEERE, J. F. — Les infections par les amibes libres. *Bull. Inst. Pasteur* 79: 171-205, 1981.
13. MARTINEZ, A. J.; NELSON, E. C. & DUMA, R. J. — Animal model: Primary Amoebic (*Naegleria*) meningoencephalitis in mice. *Amer. J. Path.* 73: 545-548, 1973.
14. MEHTA, A. P. & GUIRGES, S. Y. — Acute amoebic dysentery due to free-living amoebae treated with metronidazole. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 134-146, 1979.

15. MOLET, B. & KREMER, M. — Techniques d'études et critères morphologiques pour l'identification des amibes libres. *Bull. Soc. Sci. Vét. Comp.* 78: 215-223, 1976.
16. MOURA, H. — Amebas de vida livre em piscinas: Isolamento, identificação, potencial patogênico. Rio de Janeiro, 1980. (Dissertação de Mestrado) — Fundação Oswaldo Cruz.
17. PAGE, F. C. — An illustrated key to freshwater and soil amoeba with notes on cultivation and ecology. Cumbria, Eng. Freshwater Biological Association, 1976, (Scient. publ. 34).
18. PINTO, C. — Sobre uma ameba do gênero *Vahlkampfia* encontrada no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 15: 122-126, 1922.
19. SALAZAR, H. C.; MOURA, H. & RAMOS, R. T. — Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev. Saúde públ. São Paulo* 16: 261-267, 1982.

Recebido para publicação em 22/11/1983.