

## ISOLAMENTO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE A PARTIR DE ÁGUA MINERAL ENGARRAFADA \*

Homero Coutinho Salazar \*\*  
Hercules Moura \*\*  
Ruth Tramontani Ramos \*\*

---

SALAZAR, H. C. et al. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:261-7, 1982.

**RESUMO:** Foram isoladas amebas dos gêneros *Vahlkampfia*, *Glaeseria*, *Acanthamoeba*, *Filamoeba*, *Amoeba*, *Platyamoeba* e *Hartmanella* de dez diferentes marcas de água mineral engarrafadas, servidas no Rio de Janeiro, RJ (Brasil). Somente uma das marcas foi negativa para protozoários, enquanto que de todas as outras foram isoladas amebas de vida livre. O significado desses resultados é discutido como um indicador de qualidade da água mineral usada comercialmente, destacando-se o fato de que alguns desses microorganismos são potencialmente patogênicos.

**UNITERMOS:** Águas minerais. Água, microbiologia. Amebas.

---

### INTRODUÇÃO

Nos anos recentes, o reconhecimento do papel exercido pelos protozoários de vida livre nos problemas de contaminação das águas potáveis tem gerado maior interesse no seu estudo (Corliss<sup>6</sup>, 1973). Ortiz e Ochoterena<sup>25</sup> (1979) isolaram inúmeros protozoários da água distribuída à população da cidade do México e, entre eles, oito espécies de amebas de vida livre, sendo duas da família *Vahlkampfiidae*.

Alguns desses microrganismos podem agir como patogênicos facultativos, causando meningoencefalite em animais de laboratório (Culbertson e col.<sup>7,8,9</sup>, 1958, 1959 e 1965) e em seres humanos. Os primeiros casos da doença hoje conhecida como menin-

goencefalite amebiana primária (MEAP) foram descritos por Fowler e Carter<sup>17</sup> (1965) na Austrália e por Butt<sup>1</sup> (1966) nos EUA. Hoje mais de cem casos estão registrados na literatura (Thong e col.<sup>36</sup>, 1978), que aponta as amebas dos gêneros *Nae-gleria* e *Acanthamoeba*, respectivamente, pertencentes às famílias *Vahlkampfiidae* e *Acanthamoebidae* (Page<sup>27,28</sup>, 1967, 1974), como responsáveis pela doença.

Estes protozoários são encontrados no solo e na água (Page<sup>29</sup>, 1976), com o eventual achado de amostras virulentas a partir desses locais (Culbertson e col.<sup>9</sup>, 1965; Singh e Das<sup>35</sup>, 1970; Jadin e col.<sup>20</sup>, 1971 e Cerva<sup>4</sup>, 1971). Amebas potencialmente

---

\* Trabalho financiado parcialmente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo nº 40.0623/79.

\*\* Da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Patologia e Laboratórios da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro — Rua Teodoro da Silva, 48, 5º — 20560 — Rio de Janeiro, RJ — Brasil

patogênicas foram também isoladas do ar e da poeira de um quarto ocupado por crianças acometidas de infecção respiratória (Kingston e Warhurst<sup>22</sup>, 1969).

No Brasil, apesar de já ter sido descrito um caso de doença humana (Campos e col.<sup>3</sup>, 1977), poucos são os relatos da presença de amebas limax no ambiente. Foronda<sup>14,15,16</sup>, (1974, 1976, 1979) isolou amebas de vida livre da água de um açude, em São Paulo, provável fonte de infecção de paciente com meningoencefalite. Além disso, a autora isolou estes protozoários da água da rede de distribuição pública e do lodo de piscinas.

Salazar \* isolou, nos anos de 1978 e 1979, amebas dos gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba*, na cidade do Rio de Janeiro, a partir de diversas coleções de água. Moura<sup>25</sup> (1980) a partir de piscinas de clubes da cidade do Rio de Janeiro, isolou diversos gêneros de amebas de vida livre, sendo que algumas amostras apresentaram moderada ação patogênica para camundongos.

Em estudo anterior (Ramos e col.<sup>32</sup>, 1980) havíamos comprovado a presença de amebas de vida livre em amostras de uma única marca de água mineral muito vendida no Rio de Janeiro.

No presente trabalho tivemos como objetivo estudar a presença desses protozoários em diferentes marcas de água mineral distribuídas comercialmente nessa cidade.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas amostras de dez marcas de água mineral, dentre as mais facilmente encontradas no comércio da cidade do Rio de Janeiro. Cada marca foi identificada por uma letra, de A a J, e as amostras incluíram águas do tipo natural e gasosa, estando algumas em frascos de vidro e outras em embalagem de plástico.

As marcas B, C, E, I e J estavam todas em frascos de vidro e eram do tipo gasosa. As amostras de água mineral A e D estavam

contidas em frascos de vidro e as correspondentes às letras F, G e H eram também naturais, mas embaladas em plástico.

De cada marca foram examinados dez litros, adquiridos de uma só vez em um mesmo estabelecimento comercial.

A pesquisa foi feita filtrando-se um litro por dia, de modo que todo o volume da amostra era processado num prazo máximo de duas semanas. Empregou-se o filtro a vácuo Millipore com membrana de 50 mm de diâmetro e porosidade de 1,2 µm.

Após a filtração, a membrana era cortada ao meio e cada pedaço era colocado, com a face filtrante para baixo, em placas de Petri contendo agar não nutriente com algumas gotas de suspensão de *Enterobacter cloacae*. Uma das placas era então incubada a 37°C e a outra deixada à temperatura do laboratório.

Foram consideradas negativas as placas sem crescimento até o 20º dia de cultivo.

A metodologia seguida para cultivo, isolamento e identificação das amostras foi aquela descrita por Molet e Kremer<sup>24</sup> (1976) e Page<sup>29,30</sup> (1976), com as modificações citadas por Moura<sup>25</sup> (1980).

#### RESULTADOS

Na Tabela 1 verificamos que foram isolados oito diferentes gêneros de amebas de vida livre, sendo que *Acanthamoeba* e *Hartmanella* estiveram presentes em seis das dez marcas pesquisadas.

A marca F permitiu o isolamento de cinco gêneros de amebídeos, enquanto que as marcas A, C, D e J foram positivas para quatro gêneros. Com menor número de representantes as marcas B, E e I (dois gêneros) e a amostra H, da qual se isolou um representante do gênero *Hartmanella*.

Protozoários ciliados do gênero *Paramecium* foram repetidamente isolados da água mineral I.

Somente a água mineral cuja marca corresponde à letra G foi negativa para amebas de vida livre.

\* Dados inéditos.

T A B E L A I

Amébas de vida livre isoladas em 10 marcas de água mineral distribuídas na cidade do Rio de Janeiro.

Amostra (marca)	Gêneros e temperatura (°C)		Vahlkampfi		Acanthamoeba		Mycetozoa		Filiamoeba		Amoeba		Glaseria		Hartmannella		Platyamoeba	
	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.	37	Amb.
A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
I	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
J	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+

Os gêneros isolados cresceram bem tanto à temperatura ambiente como a 37°C, com a exceção da única amostra de *Platyamoeba* isolada, que só se desenvolveu na placa deixada à temperatura do laboratório.

A Tabela 2 mostra o percentual de placas positivas, verificando-se as marcas que apresentam maiores índices de contaminação. Esses níveis são quase sempre mais elevados nas placas em que o cultivo foi feito à temperatura do laboratório.

T A B E L A 2

Percentagem de placas positivas para cada marca e temperatura de cultivo.

Amostra (marca)	Percentagem de placas positivas	
	Temperatura ambiente	37°C
A	70	30
B	20	0
C	20	20
D	100	80
E	20	10
F	100	100
G	0	0
H	40	20
I	10	10
J	40	30

#### DISCUSSÃO

O isolamento de amebas de vida livre a partir de águas de abastecimento de cidades e de água mineral tem sido relatado nos anos recentes, principalmente na literatura belga (Jadin e col.<sup>21</sup>, 1972), francesa (Paix <sup>31</sup>, 1974) e recentemente nas américas (Ramos e col.<sup>32</sup>, 1980; Rivera e col.<sup>33</sup>, 1981).

Examinando diferentes marcas de água mineral vendidas na cidade do Rio de Janeiro, verificamos que 90% das amostras permitiram o isolamento de protozoários, sendo que 60% delas foram positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba*.

Oito diferentes gêneros de amebídeos foram identificados nas dez marcas estu-

dadas, sendo que *Vahlkampfia*, *Mayorella*, *Filamoeba*, *Glaeseria*, *Amoeba*, *Platyamoeba* e *Hartmanella* ainda não haviam sido anteriormente assinalados em águas minerais.

Uma das amostras (I), da qual foram isolados protozoários do gênero *Paramaecium*, deve ser relacionada com matéria orgânica em decomposição (Ortiz e Ochoterena <sup>26</sup>, 1979; Corliss <sup>6</sup>, 1973), o que caracteriza a água como imprópria para o consumo.

Esses níveis de contaminação não deveriam ocorrer em águas servidas à população e provavelmente são devidas à falta de tratamento da água a ser engarrafada, pois os achados correspondem a levantamentos feitos em locais onde fatores diversos podem, ocasional ou permanentemente, contribuir para aumento da população microbiana.

Os resultados das marcas F e G, ambas embaladas em plástico, reforçam a hipótese de contaminação no local da colheita, de vez que os frascos de F apresentaram 100% de positividade, enquanto que os de G foram negativos em todos os cultivos.

A gaseificação parece não ter influenciado na positividade das amostras, o que já fora relatado em estudos feitos por Paix <sup>31</sup> (1973), na Europa, ao encontrar resultados semelhantes em águas minerais e gasosas.

As marcas de água mineral com 100% de positividade, como D e F, apresentaram nas placas de isolamento maior concentração de protozoários, enquanto que os frascos rotulados como B, C e E apresentaram, proporcionalmente, menor número de microrganismos.

Quanto à temperatura de cultivo, a incubação a 37°C parece ter sido fator limitante para melhor se poder avaliar o nível global de contaminação por amebas de vida livre. Entretanto, como as amostras patogênicas até agora isoladas crescem bem a 37°C, esta temperatura pode ser usada visando o isolamento seletivo de amostras potencialmente patogênicas (Griffin <sup>18</sup>, 1972).

Dentre as amebas isoladas, somente no gênero *Acanthamoeba* são encontrados representantes patogênicos. O fato de não

termos isolado nenhuma amostra de *Naegleria* não afasta a possibilidade de sua presença nessas águas, de vez que o habitat desse gênero é o mesmo dos outros protozoários que conseguimos isolar.

Por outro lado, como o principal alimento das amebas de vida livre são microorganismos, fica claro que elas aumentam em número com a contaminação bacteriana. Dangeard<sup>11</sup> (1910), cita que "não existem amebas sem a presença de bactérias", afirmação que reforça a importância desses resultados como indicadores do grau de contaminação das águas minerais examinadas.

Ainda que a manifestação de patogenicidade dessas amebas esteja quase sempre relacionada com episódios de meningoencefalite fatal (Willaert<sup>37</sup>, 1977), um caso de disenteria aguda foi descrito por Metha e Guirges<sup>28</sup> (1979) em que o agente etiológico seria uma ameba do gênero *Acanthamoeba*. Ainda não existem, entretanto, evidências concretas para que possamos afirmar que a ingestão desses protozoários possa causar doença (Carter<sup>3</sup>, 1968, Chang<sup>5</sup>, 1979 e Cursons e col.<sup>10</sup>, 1979).

Devemos considerar também que bactérias e partículas virais foram identificadas no

citoplasma e no núcleo dessas amebas (Schuster<sup>34</sup>, 1969; Dunnebacke e Schuster<sup>12,13</sup>, 1974, 1977), que poderiam agir como veiculadores de agentes patogênicos. Além disso, Jadin e Willaert<sup>19</sup> (1977) comprovaram a viabilidade do *Mycobacterium vaccae obuense*, entre outras espécies do mesmo gênero, que havia sido fagocitado por amebídeos.

#### CONCLUSÕES

O isolamento de diversas amostras de amebas de vida livre em 9 entre 10 marcas de água mineral distribuídas comercialmente na cidade do Rio de Janeiro \* constitui achado que mostra grau indesejável de contaminação, inclusive com a veiculação de amostras de *Acanthamoeba*, microrganismo cuja ação patogênica ainda é pouco conhecida.

Esses resultados apontam também para as falhas ao nível do processamento e do controle de produtos consumidos em larga escala, quase sempre como opção de quem deseja usar um produto mais limpo e seguro.

---

SALAZAR, H. C. et al. [Isolation of free-living amoebae from bottled mineral water]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:261-7, 1982.

**ABSTRACT:** Amoebae of the genera *Vahlkampfia*, *Glaeseria*, *Acanthamoeba*, *Filamoeba*, *Amoeba*, *Platyamoeba* and *Hartmanella* were isolated from ten different brands of bottled mineral water used in Rio de Janeiro. Of these brands, only one was negative after an incubation period of twenty days, while the others were all positive for free living amoebae. The results are discussed as an indicator of the quality of commercially used mineral water and it is stressed that some of these microorganisms are potentially pathogenic.

**UNITERMS:** Mineral waters. Water microbiology. Amoeba.

---

\* Um relatório com os resultados obtidos, indicando o nome comercial de cada uma das águas minerais examinadas, foi encaminhado ao Departamento de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde do Município do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUTT, C.G. Primary amoebic meningoencephalitis. *New Engl. J. Med.*, 274:1473-6, 1966.
2. CAMPOS, R.; GOMES, M.C.O.; PRIGENZI, L.S. & STECCA, J. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino-americano. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 19:349-51, 1977.
3. CARTER, R.F. Primary amoebic meningoencephalitis: clinical pathological features of six fatal cases. *J. Pathol. Bacteriol.*, 96:1-25, 1968.
4. CERVA, L. Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain Vitek. *Folia parasitol.*, Praha, 18:171-6, 1971.
5. CHANG, S.L. Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia parasitol.*, Praha, 26:195-200, 1979.
6. CORLISS, J.O. Protozoan ecology: a note on its current status. *Amer. Zool.*, 13:145-8, 1973.
7. CULBERTSON, C.G.; SMITH, J. & MINNER, J. *Acanthamoeba* observations on animal pathogenicity. *Science*, 127:1506, 1958.
8. CUBERTSON, C.G.; SMITH, J.; COHEN, H. & MINNER, J. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Amer. J. Pathol.*, 35:185-97, 1959.
9. CULBERTSON, C.G.; ENSMINGER, P.W. & OVERTON, W.M. The isolation of additional strains of pathogenic *Hartmannella* sp. (*Acanthamoeba*). Proposed culture method for application to biological material. *Amer. J. clin. Pathol.*, 43:383-7, 1965.
10. CURSONS, R.T.M.; KEYS, E.A.; BROWN, T.J.; LEARMONTH, J.; CAMBELL, C. & METCALF, P. IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet*, 1:223-4, 1979.
11. DANGEARD, P. Etude de la karyokinèse chez *Amoeba hyalina* sp. nov. *Le Botanist*, 7:49-83, 1910.
12. DUNNEBACKE, T.H. & SCHUSTER, F.L. An infectious agent associated with amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.*, 21:327-9, 1974.
13. DUNNEBACKE, T. H. & SCHUSTER, F.L. The nature of a cytopathogenic material present in amoeba of the genus *Naegleria*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 26:412-21, 1977.
14. FORONDA, A.S. Crescimento de amebas de vida livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano (Nota prévia). *Rev. paul. Med.*, 87:140, 1976.
15. FORONDA, A.S. Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas. São Paulo, 1979. [Tese de Doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas USP]
16. FORONDA, A.S. & FERREIRA, C.S. Cultivo de amebas com as características de *Hartmannella* — *Acanthamoeba* e *Naegleria* em infusões de feno (Nota prévia). *Rev. paul. Med.*, 84:55, 1974.
17. FOWLER, M. & CARTER, R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Brit. med. J.*, 2:740-2, 1965.
18. GRIFFIN, J.L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science*, 178:869-70, 1972.
19. JADIN, J.B. & WILLAERT, E. Mastigamoeba et amibes libres à partir du mucus nasal de lépreux. *Acta leprol.*, (66/67): 271-3, 1977.
20. JADIN, J.B.; HERMANNE, J.; ROBYN, G.; WILLAERT, E.; VAN MAERCKE, Y. & STEVENS, N. Trois cas de meningoencephalite ambiene primitive observés a Anvers (Belgique). *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 51:255-66, 1971.
21. JADIN, J.B.; WILLAERT, E. & COMPÈRE, F. De la nécessité du contrôle biologique des eaux potables. *Bull. Acad. Nat. Med.*, 156:995-9, 1972.
22. KINGSTON, D. & WARHURST, D.C. Isolation of amoebae from the air. *J. med. Microbiol.*, 2:27-36, 1969.
23. MEHTA, A.P. & GUIRGES, S.Y. Acute amoebic dysentery due to free-living amoebae treated with metronidazole. *J. trop. Med. Hyg.*, 82:134-6, 1979.
24. MOLET, B. & KREMER, M. Techniques d'études et critères morphologiques pour l'identification des amibes libres. *Bull. Soc. Sci. vét. Med. comp.* 78:215-23, 1976.

25. MOURA, H. Amebas de vida livre em piscinas: isolamento, identificação, potencial patogênico. Rio de Janeiro, 1980. [Dissertação de Mestrado — Fundação Osvaldo Cruz]
26. ORTIZ, T.P. & OCHOTERENA, L.E. Analisis taxonomico de las especies de protozoários encontradas en el agua potable de la ciudad de México D.F. *Rev. lat. amer. Microbiol.*, 21:147-51, 1979.
27. PAGE, F.C. Redefinition of the genus *Acanthamoeba* with description of three new species. *J. Protozool.*, 14:709-24, 1967.
28. PAGE, F.C. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with description of new species and a Key to genera. *Arch. Protistenk.*, 116:149-84, 1974.
29. 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).
30. PAGE, F.C. A revised classification of the *Gymnamoebia* (Protozoa: Sarcodina). *Zool. J. Linn. Soc.*, 58:61-77, 1976.
31. PAIX, D.L. Recherche systematique d'amibes dans les eaux minerales. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 54:432-5, 1974.
32. RAMOS, R.T.; MOURA, H. & SALAZAR, H.C. Isolamento de amebas de vida livre de água mineral. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 5º, Rio de Janeiro, 1980. *Resumos*. Rio de Janeiro, 1980. p. 60.
33. RIVERA, F.; GALVAN, M.; ROBLES, E.; LEAL, P.; GONZALEZ, L. & LACY, A.M. Bottled mineral waters polluted by protozoa in México. *J. Protozool.*, 28:54-6, 1981.
34. SCHUSTER, F.L. Intranuclear virus-like bodies in the amoeba-flagellate *N. gruberi*. *J. Protozool.*, 16:724-7, 1969.
35. SINGH, B.N. & DAS, S.R. Studies of pathogenic and nonpathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order *Amoebida*. *Phil. Trans. roy. Soc.*, 259:435-76, 1970.
36. THONG, Y.H.; FERRANTE, A.; SHEPHERD, C. & ROWAN-KELLY, B. Resistance of mice to *Naegleria meningoen- cephalitis* transferred by immune serum. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 72:650-2, 1978.
37. WILLAERT, E. The pathogenicity of free-living amoebae. *Rev. Ass. belge Technol. Lab.*, 4:101-22, 1977.

Recebido para publicação em 24/11/1981

Aprovado para publicação em 17/02/1982