

CAPACIDAD PATOGENA PARA EL RATON ALBINO
DE ALGUNAS ESPECIES DE *ACANTHAMOEBA*
Y *HARTMANNELLA*

BATISTA DÍAZ, N.; MASCARÓ LAZCANO, C.; GUEVARA BENÍTEZ, D. C.;
OSUNA CARRILLO, A.

Departamento de Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
Granada (España)
(Recibido el 20-7-1981)

SUMMARY

The authors tested the pathogenic capacity of several *Limax* amoebae isolated in Spain, on albino mice. Intracerebral and intranasal inoculations were carried out.

The species are: *Acanthamoeba polyphaga* DPGr-1, *A. castellanii* DPGr-1, *A. sp* DPGr-1, *Hartmannella vermiformis* DPGr-1, *H. glebae* DPGr-1, *H. exudans* DPGr-1 y *H. leptocnemus* DPGr-1.

Key Words: *Acanthamoeba*; experimental inoculations; *Hartmannella*.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la capacidad patógena de distintas especies de amebas *Limax* aisladas en nuestro país (en Jaén, Valencia, Granada, y de un agua mineral comercializada), realizando inoculaciones experimentales por vía intracerebral e intranasal, sobre ratón albino. Dichas especies son: *Acanthamoeba polyphaga* DPGr-1, *A. castellanii* DPGr-1, *A. sp* DPGr-1, *Hartmannella vermiformis* DPGr-1, *H. glebae* DPGr-1, *H. exudans* DPGr-1 y *H. leptocnemus* DPGr-1.

Palabras Clave: *Acanthamoeba*; inoculaciones experimentales; *Hartmannella*.

INTRODUCCION

La realización de inoculaciones en animales de experimentación, permite detectar de modo bastante aproximado la posible capacidad patógena de una cepa de ameba *Limax* determinada, según el criterio de la mayoría de los autores.

Aunque la vía natural de entrada de estas amebas en los organismos animales se supone es la vía nasal, se eligió la vía intracerebral para realizar una serie previa de experiencias, a fin de seleccionar aquellas amebas capaces de mostrarse patógenas por esta vía, estudiándose a continuación su capacidad invasiva por vía nasal. De este modo se determina el grado de patogenicidad según la escala de ČERVA (1971) de patogenicidad.

MATERIAL Y METODOS

Para las inoculaciones se utilizaron ratones variedad suiza albina (cepa de la casa Ibys), de 3-4 semanas de edad.

El tiempo de mantenimiento de los animales tras la inoculación variaba según las vías de inoculación y las dosis empleadas.

Las vías de inoculación utilizadas en las experiencias fueron la intracerebral (IC) y la intranasal (IN). Las amebas inoculadas por vía IC procedían de cultivos axénicos en medio TC199. Las amebas a inocular por vía IN se obtenían de placas de agar NN más 0,005 % de ClNa, sembradas previamente con las amebas, que eran recogidas por lavado con agua destilada estéril.

Antes de cada experiencia se realizaba un recuento del número de amebas a inocular en una cámara de Neubauer.

a) Inoculación IN. Las experiencias se programaban tanto a corto como a largo plazo. En las experiencias a corto plazo se sacrificaban los animales supervivientes a los 15 y 30 días post-inoculación (PI); en las programadas a largo plazo, los animales se sacrificaban a los 60 y 75 días PI, aproximadamente.

Las inoculaciones se realizaban depositando un volumen de 0,01-0,02 ml sobre uno de los orificios nasales del animal, mediante una jeringa de plástico estéril, calibrada a la centésima de ml.

b) Inoculación IC. La programación de las experiencias se hizo a corto y a largo plazo; en las primeras se sacrificaban los

animales supervivientes a los 15 días PI, y en las segundas, a los 30 días PI.

Las inoculaciones se realizaban en una cámara de flujo laminar vertical y utilizando material estéril. Para llevarlas a cabo, utilizamos una jeringa de vidrio, esterilizable por ebullición, llenándola con 0,01 ml de suspensión amebiana. Para inocular las amebas, se introducía la aguja de la jeringa en el cráneo, hasta alcanzar la masa encefálica. Los animales a inocular por esta vía eran previamente anestesiados con éter.

c) Exámenes postmortem. En todas las experiencias, los ratones una vez muertos o sacrificados, eran examinados lo antes posible. Según el tipo de inoculación se aislaban y analizaban de modo rutinario determinados órganos y estructuras. Así, tras inoculación IN, los órganos aislados eran el cerebro, bulbos olfatorios y pulmones. Tras inoculación IC, los órganos a estudiar eran el cerebro y la médula. Para detectar la presencia de amebas en estos órganos, se realizaban cultivos de éstos sobre agar NN, que eran incubados en estufa a $32 \pm 1^\circ \text{C}$. Tras 3-4 días de incubación, se tomaban muestras de estos cultivos, que eran observados al microscopio.

d) Criterio de patogenicidad. El criterio que aplicamos para adscribir un determinado grado de patogenicidad a cada una de las cepas estudiadas, fue la escala de patogenicidad de ČERVA.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos están referidos al número de muertes ocurridas entre los animales inoculados, así como a la presencia de amebas, tanto en forma quística como trofozoica en los animales inoculados, tanto en los fallecidos como en los supervivientes, que eran posteriormente sacrificados.

Estos resultados se recogen en los cuadros 1 y 2.

CUADRO NUM. 1

RESULTADOS DE LAS INOCULACIONES IC E IN, SOBRE RATON ALBINO
 IC cp = Inoculación IC a corto plazo. IC lp = Idem a largo plazo. IN cp =
 = Inoculación IN a corto plazo. IN lp = Idem a largo plazo. NM(PI)/
 NRL = Número de ratones fallecidos (día PI)/Número de ratones por lote.
 SP = Especie inoculada.

SP		NM(PI)/NRL
<i>A. polyphaga</i>	IC cp	0/6
	IC lp	0/10
	IN cp	0/18
	IN lp	0/12
<i>A. castellanii</i>	IC cp	0/10
	IC lp	0/10
	IN cp	0/9
	IN lp	0/12
<i>A. sp</i>	IC cp	0/9
	IC lp	0/10
	IN cp	0/12
	IN lp	0/12
<i>H. vermiformis</i>	IC cp	1 (14)/9
	IC lp	1 (16)/8
	IN cp	0/18
	IN lp	0/12
<i>H. glebae</i>	IC cp	0/9
	IC lp	1 (14)/10
	IN cp	0/12
	IN lp	0/12
<i>H. exudans</i>	IC cp	0/9
	IC lp	0/10
	IN cp	0/10
	IN lp	2 (3,6)/9
<i>H. leptocnemus</i>	IC cp	1 (2)/10
	IC lp	2 (3,4)/10
	IN cp	0/10
	IN lp	0/10

CUADRO NUM. 2

RECUPERACION DE TROFOZOITOS Y QUISTES DE DIVERSOS ORGANOS MEDIANTE CULTIVO EN AGAR NN

IC cp = Inoculación IC a corto plazo. IC lp = Idem a largo plazo.
 IN cp = Inoculación IN a corto plazo. IN lp = Idem a largo plazo.
 C = Número de ratones que presentaron amebas en cerebro. M = Idem en
 médula. P = Idem en pulmón. BO = Idem en bulbos olfatorios. (SPI) = Sa-
 crificio a los ... días postinfección. SP = Especie inoculada.

SP	IC cp			IC lp			IN cp				IN lp			
	(SPI)	C	M	(SPI)	C	M	(SPI)	C	P	BO	(SPI)	C	P	BO
<i>A. polyphaga</i>	(14)	2	1	(35)	0	0	(28)	0	0	0	(100)	0	0	0
<i>A. castellanii</i>	(14)	0	0	(35)	0	0	(32)	0	0	0	(102)	0	1	0
<i>A. sp</i>	(14)	4	3	(34)	8	0	(31)	0	0	0	(75)	0	0	0
<i>H. vermiformis</i>	(14)	0	1	(21)	0	2	(31)	0	0	0	(74)	0	0	0
<i>H. glebae</i>	(14)	1	0	(33)	1	0	(30)	0	0	0	(75)	0	0	0
<i>H. exudans</i>	(15)	0	0	(31)	0	0	(33)	0	0	0	(42)	0	0	0
<i>H. leptocnemus</i>	(15)	2	0	(32)	0	0	(38)	0	0	0	(54)	0	0	0

DISCUSION

De forma general, podemos señalar que ninguna de las espe-
 cies estudiadas ha resultado ser verdaderamente patógena de
 acuerdo con la escala de patogenidad de CERVA, puesto que todas
 resultaron incluidas en los grados I y II de patogenidad (amebas
No patógenas). El grado II corresponde a aquellas amebas capa-
 ces de enquistarse y sobrevivir en el cerebro de ratones tras
 inoculación IC, mientras que al grado I pertenecen amebas in-
 capaces de hacerlo.

Así, a *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis* y
H. exudans, les corresponde un grado de patogenidad I, y a *A. po-
 lyphaga*, *A. sp*, *H. glebae* y *H. leptocnemus*, un grado de patoge-
 nidad II.

El comportamiento de la cepa estudiada de *A. polyphaga* contrasta con el de las cepas patógenas de esta especie, estudiadas por otros autores (ČERVA, 1971; DERR-HARF y col., 1978; VISVESVARA y col., 1975), así como observamos que, al contrario de lo observado por KASPRZAK y col. (1974) para cepas de origen libre, esta cepa no muestra una tendencia neumotrópica en los animales inoculados. Otros autores también aíslan cepas de esta especie que resultaron apatógenas para animales de experimentación (ČERVA y HULDT, 1974; DAS y SINGH, 1970; DERR-HARF y col., 1978; SAWYER y col., 1977).

La cepa estudiada de *A. castellanii* se mostró incapaz de sobrevivir en cerebro, tanto tras inoculación IN como IC, siendo sin embargo capaz de asentarse en el tejido pulmonar de uno de los 40 animales inoculados, observándose numerosos quistes viables en dicho tejido. Esto confirma la gran influencia de la susceptibilidad individual en el asentamiento de las amebas en distintos tejidos. De esta especie se han aislado tanto cepas patógenas (ČERVA, 1967 a, b; DERR-HARF y col., 1978; MCCOWEN y GALLOWAY, 1959; PROCA y col., 1973), como apatógenas (ČERVA, 1971; CULBERTSON y col., 1965; DAS y SINGH, 1970; SAWYER y col., 1977).

La patogenicidad de *A. sp.*, especie no adscribible a ninguna de las descritas, se estudia por primera vez en este trabajo, por lo que no existen antecedentes al respecto. Hemos de tener en cuenta que fue la cepa que mostró mayor capacidad de supervivencia en tejido cerebral.

La cepa de *H. vermiformis* estudiada en este trabajo, se mostró apatógena, aunque hemos de resaltar como curioso el hecho de que en ninguno de los animales inoculados en nuestras experiencias (en las que murieron dos de ellos), se detectó la presencia de amebas en cerebro, pero sí en la médula de tres de los ratones inoculados.

Otros autores consideran también apatógenas las cepas de esta especie aisladas por ellos (ČERVA, 1971; ČERVA y HULDT, 1974; DAS y SINGH, 1970).

La cepa de *H. glebae* estudiada se mostró apatógena para el ratón albino en nuestras experiencias, lo que coincide con lo señalado por DAS y SINGH (1970), únicos autores que habían estudiado la patogenicidad de esta especie hasta el momento. A pesar de que murió uno de los animales a los 14 días PI (vía IC) en el

curso de nuestras experiencias, no pudo demostrarse en él la presencia de amebas.

Aunque murieron tres de los animales en el curso de las experiencias realizadas con *H. exudans*, no pudieron adscribirse estos fallecimientos a la acción de esta cepa, puesto que no se aislaron formas amebianas viables de dichos animales. Por lo tanto se le adscribió un carácter no patógeno a la cepa estudiada de esta especie, que confirma lo observado por otros autores para otras cepas de esta especie (ČERVA, 1971; ČERVA y HULDT, 1974; DAS y SINGH, 1970).

No existen antecedentes respecto al estudio del posible poder patógeno de *H. leptocnemus*. En los resultados obtenidos en este trabajo, se incluye la muerte de dos de los animales tras inoculación IC, pero en un periodo de tiempo demasiado corto (2 y 3 días) para ser considerado como significativo.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, hemos de destacar el comportamiento relativamente inconstante de las diferentes especies consideradas, puesto que se presentaron casos en que los hospedadores morían tras inoculación IN o IC sin recuperación posterior de las amebas de sus órganos; casos de alteraciones del comportamiento en hospedadores en los que aparentemente el parasitismo no prendió, etc.

Todo esto resalta el gran papel que juega el factor individual en las consecuencias del parasitismo, por lo que deben buscarse unos criterios adecuados de evaluación de la capacidad patógena de estos rizópodos.

REFERENCIAS

- ČERVA, L. (1967a): Intracerebral inoculation of experimental animals in pathogenetical studies of *Acanthamoeba castellanii*. *Folia Parasitologica (Praha)*, 14: 171-175.
- ČERVA, L. (1967b): Intranasal, intrapulmonary and intracardial inoculation of experimental animals with *Hartmannella castellanii*. *Folia Parasitologica (Praha)*, 14: 207-215.
- ČERVA, L. (1971): Studies of limax amoebae in a swimming pool. *Hydrobiologia*, 38: 141-151.
- ČERVA, L.; HULDT, G. (1974): Limax amoebae in five swimming pools in Stockholm. *Folia Parasitologica (Praha)*, 24: 221-228.

- CULBERTSON, C. G.; ENSMINGER, P. W.; OVERTON, W. M. (1965): The isolation of additional strains of pathogenic *Hartmannella* sp (*Acanthamoeba*). *American Journal of Clinical Pathology*, 43: 383-387.
- DAS, S. R.; SINGH, B. N. (1970): Disease potential of free-living amoebae: virulence and chemotherapy of free-living amoebae. *Journal of Parasitology*, 56: 67.
- DERR-HARF, C.; MOLET, B.; SCHREIBER, J.; KREMER, M. (1978): Epidemiologie des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. *Annales de Parasitologie*, 53: 467-477.
- KASPRZAK, W.; MAZUR, T.; RUCKA, A. (1974): Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, 54: 351-357.
- MCCOWEN, M. C.; GALLOWAY, R. B. (1959): Studies on pathogenic strains of *Acanthamoeba* sp. *Journal of Protozoology*, 6 (suppl.): 22.
- PROCA, M. I.; LUPASCU, GH.; STERIU, D. (1973): Isolation of a pathogenic strain of *Acanthamoeba castellanii* in Romania. *Archives Roumaines of Pathology and Experimental Microbiology*, 32: 205-210.
- SAWYER, T. K.; VISVESVARA, G. S.; HARKE, B. A. (1977): Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science*, 196: 1324-1325.
- VISVESVARA, G. S.; JONES, D. B.; ROBINSON, H. N. (1975): Isolation, identification and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24: 784-790.