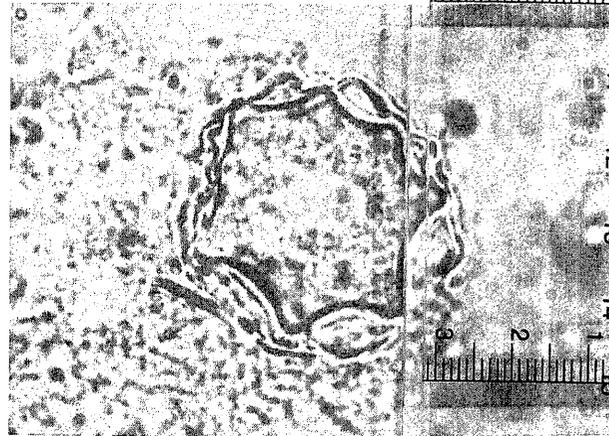


DIEGO GUEVARA POZO
CATEDRATICO DE PARASITOLOGIA

400840
MADE IN SPAIN

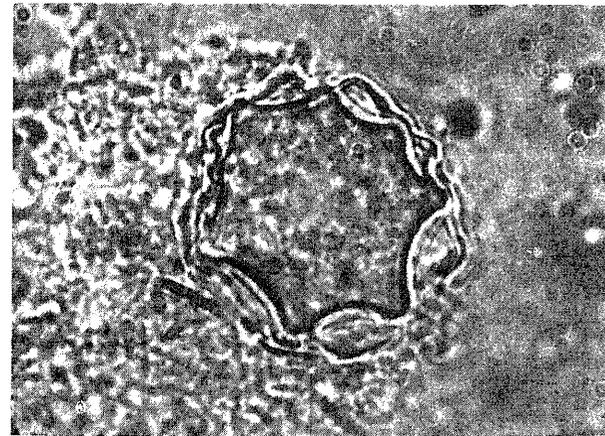
LAS AMEBAS LIMAK



DISCURSO DE APERTURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
CURSO MCMLXXVIII - MCMLXXIX

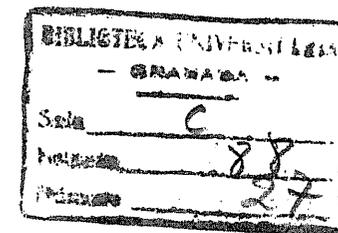
DIEGO GUEVARA POZO
CATEDRATICO DE PARASITOLOGIA

LAS AMEBAS LIMAX



DISCURSO DE APERTURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
CURSO MCMLXXVIII – MCMLXXIX

LAS AMEBAS LIMAX



K. 48. 337

DIEGO GUEVARA POZO
CATEDRATICO DE PARASITOLOGIA

J

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento <u>241647</u>
N.º Copia <u>241652</u>

LAS AMEBAS LIMAX



DISCURSO DE APERTURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
CURSO MCMLXXVIII – MCMLXXIX

© UNIVERSIDAD DE GRANADA. LAS AMEBAS LIMAX. Editado e impreso por el Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Granada. Un.Gr.90.78.37. Depósito legal Gr. 406. 1978. ISBN. 84.338.0102.3. Printed in Spain. 350 ejemplares.

Imprenta de la Universidad de Granada. Hospital Real. Cuesta del Hospicio s/n.

A MODO DE INTRODUCCION

Excmo. Sr. Rector Magnífico
Excmos. e Ilmos. señores
Sras., Señores, Compañeros y Alumnos

Es preceptivo que en el solemne acto de Apertura del Curso Académico pronuncie un discurso o conferencia un catedrático de la Universidad. Existe además la norma de seguir un sistema de turno rotatorio entre las Facultades que la integran y, dentro de cada Facultad, debe actuar el catedrático más antiguo que no haya todavía cumplido con este deber académico.

En el presente curso me ha correspondido el cumplimiento de este deber, que acepto con gratitud y disciplina, pero al mismo tiempo con justificado temor.

Por algunos de los muy respetados profesores y maestros que me han precedido en esta tribuna he sabido el alto compromiso que tan honrosa designación constituye, y también la gran responsabilidad que representa. Porque, efectivamente, quien desde aquí dirige la palabra a tan relevante auditorio debería estar dotado de cualidades capaces de hacer que el tema desarrollado posea amenidad, altura de pensamiento a tenor de quienes escuchan, interés para no defraudar a los oyentes, y cierta actualidad que justifique su disertación en este momento de la vida universitaria.



Creo sinceramente, sin la menor sombra de falsa modestia, que carezco de aquellas cualidades, por lo que, contando anticipadamente con la benevolencia de quienes me escuchan, la única cualidad que puedo ofrecer con el tema elegido será, tal vez, el interés que en la actualidad está adquiriendo, en el campo de la Parasitología, un grupo de protozoos que, conocidos desde antiguo pero considerados como seres de vida libre hasta hace relativamente pocos años, se va ahora descubriendo en ellos carácter parasitario y acciones patógenas para el hombre y los animales, por lo que cada día son más tenidos en cuenta como un peligro latente, y, por ello quizás más temible, para la salud y la vida del hombre.

Otra razón que haga quizá perdonable la elección del tema reside en que sobre el mismo se han realizado, y se siguen realizando, investigaciones en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de esta Universidad de Granada, con la valiosa aportación del Instituto López-Neyra, y creemos que son, al menos en la forma de abordar hasta ahora el tema, las primeras en España.

Nos estamos refiriendo a las llamadas "AMEBAS LIMAX", protozoos muy frecuentes y difundidos.

LOS PARASITOS

Concepto y antecedentes.- Debemos admitir que aún no se tienen sobre este grupo de protozoos conocimientos suficientes para poder dar de ellos una definición que los abarque a todos y al mismo tiempo no incluya ninguna especie extraña al mismo.

De manera solamente aproximativa y provisional se puede decir que es "Un grupo abierto (no taxonómico) de protozoos, con movimiento ameboide (algunas especies pueden emitir flagelos en ciertas fases), de pequeño tamaño (no superior a 50 micras en sus formas trofozoicas), que normalmente hacen vida libre en numerosos y diversos biotopos, donde se alimentan saprozoica o saprofiticamente, de preferencia en medios acuáticos de agua dulce, capaces de desarrollar formas quísticas de resistencia y que, en circunstancias (no todas bien conocidas) pueden parasitar al hombre, teniendo a veces elevada acción patógena".

Con la denominación de "grupo abierto" que hemos aplicado a las "Amebas Limax" queremos significar que el número de familias, géneros y especies que deben ser incluidas bajo dicho nombre está sujeto actualmente a constante revisión y estudio por los especialistas de casi todos los países, por lo que su contenido y encuadre está continuamente variándose a medida que avanza lo que se conoce sobre estos rizópodos.

Puede afirmarse que las "Amebas Limax" hubieron de ser conocidas desde los tiempos en que el microscopio compuesto se aplicó a la observación de los seres vivos que, invisibles a simple vista, podían hallarse en medios naturales tales como sedimentos y aguas de ríos, charcas, pantanos, piscinas, e incluso en sedimentos de fondos marinos, tierras húmedas, etc. etc., donde también suelen vivir. Estos primeros estudios estaban, lógicamente, limitados a la descripción de su forma, tamaño, aspectos en general, y a la manera tan particular e interesante de moverse mediante la emisión de pseudópodos.

Pero hasta tiempos relativamente recientes no se comenzó a sospechar, equivocadamente primero y con seguro acierto después, el papel patógeno que pueden tener algunas de las especies incluidas bajo la denominación de "Amebas Limax", a las que también se les suele llamar "pequeñas amebas de vida libre" para distinguirlas de otras amebas, también de vida libre, de mayor tamaño y que nunca adoptan la vida parasitaria.

Morfología.-- Puesto que bajo el nombre de "Amebas Limax" se agrupan diversas especies, que a su vez pertenecen a géneros y aún familias distintas, es lógico que su morfología y su biología también difieran entre sí.

No obstante, podemos mencionar algunas características morfológicas más o menos generales y comunes. Debemos considerar dos estados o fases de su biología: las fases móviles o *trofozoítos* y las formas de resistencia llamadas *quistes*.

Trofozoitos: Son relativamente pequeños, no rebasando, como ya se dijo, las 50 micras de diámetro, a diferencia de otras amebas de vida libre que hasta ahora no se han demostrado que sean patógenas aunque pueden encontrarse en

los mismos biotopos que las "Amebas Limax", y cuyos trofozoítos alcanzan dimensiones mucho mayores (géneros *Amoeba*, *Pelomixa*, y otros). Suele distinguirse en ellos una finísima membrana plasmática elástica e invisible al microscopio de luz ordinaria. La elasticidad y facilidad de reconstrucción de esta membrana les permite la emisión de pseudópodos para su movilidad y captación del alimento. Generalmente se considera que la forma de los trofozoítos en absoluto reposo es la esférica, pero debido a la continua formación de pseudópodos suelen aparecer de muy variadas formas y aspectos, si bien hay cierta constancia en la forma de los pseudópodos, y en la manera de producirse éstos, dentro de un determinado género o especie. Sin embargo, como más adelante veremos, tales diferencias morfológicas no suelen ser lo suficientemente constantes como para fundamentar solamente en ellas los encuadramientos taxonómicos, entre otras razones porque tales aspectos de su morfología cambian según el medio en que las amebas se encuentran (medios líquidos con diferentes viscosidades y presiones osmóticas, superficies de cuerpos sólidos, temperatura, etc., etc.).

Frecuentemente puede apreciarse en ellas un ectoplasma hialino y un endoplasma granuloso con vacuolas que pueden incluir partículas alimenticias, frecuentemente bacterias, u otros restos vegetales o animales. También pueden alojarse en el endoplasma una o más vacuolas pulsátiles de función osmorreguladora.

Principalmente a expensas del ectoplasma se originan las prolongaciones pseudopódicas, que pueden adoptar diversas formas, como ocurre en las especies del género *Acanthamoeba*, que son largas, puntiagudas y en ocasiones ramificadas, dándoseles el nombre de acantópodos.

En ciertas fases de algunas especies suelen también desarrollarse flagelos como órganos de locomoción. No forman flagelos, por ejemplo, las especies de la familia *Hartmannellidae* (Kingston y Wahrust, 1969), sí los forman las del género *Naegleria*.

El núcleo de estas amebas suele ser vacuolar, apreciándose un nucleolo central o excéntrico. Algunos autores consideran como carácter diferencial entre géneros y especies la permanencia o la desaparición del nucleolo y de la membrana nuclear al iniciarse la mitosis reproductora.

Quistes: Las formas quísticas o formas de resistencia, que permiten la dispersión de las "Amebas Limax" en condiciones adversas en las que los trofozoítos no podrían sobrevivir, poseen, como todas las formas quísticas, una pared externa gruesa y resistente; a veces esta membrana o pared del quiste es doble, habiendo una membrana externa y otra interna, siendo esta última de aspecto poliédrico, cuyos vértices o salientes contactan con la pared externa, como acontece en las especies del género *Acanthamoeba* (Volkousky, 1931), si bien este género no es aceptado por todo los autores.

Al microscopio electrónico se ha señalado en el citoplasma un retículo endoplasmático poco desarrollado; el aparato de Golgi, particularmente en las especies del género *Hartmannella*; ribosomas; y mitocondrias que no se han podido demostrar en todas las "Amebas limax". La cubierta externa de estas amebas está constituida por una membrana unidad recubierta de una capa externa posiblemente de mucopolisacáridos. Las vacuolas que se producen en el citoplasma están limitadas por una membrana unidad, como la externa de la ameba, de la cual derivan.

Proca-Cioban y Gancevici, en agosto de este año, dan cuenta de los cambios que sufre una cepa de *Acanthamoeba sp.* durante su envejecimiento en cultivo axénico. Entre otras variaciones comprueban el aumento de los lípidos y disminución de prótidos y carbohidratos. Descubren, por primera vez en los protozoos según estos autores, los orgánulos celulares "catalisomas" que intervienen en la síntesis de los lípidos. Los encuentran en la superficie interna de las inclusiones lipídicas, las cuales aumentan sensiblemente con la edad de los cultivos, sufriendo una forma de "degeneración grasa" semejante a la que ocurre en las células de los mamíferos viejos, lo que da pie a los autores para sugerir la existencia de "un mecanismo básico" de envejecimiento celular.

Ordenación taxonómica de "Amebas Limax". Parece que fueron Hertwig y Lessert quienes en 1874 realizaron los primeros intentos serios encaminados a su claficiación taxonómica y diferenciación específica fundada en el aspecto morfológico y en su manera de emitir los pseudópodos. A partir de entonces son muchos los especialistas que han realizado estudios con el mismo propósito, aunque fundamentando sus clasificaciones en aspectos de su biología y en ciertas fases de su división mitótica.

Aceptando como válida la clasificación de los protozoos hecha por Honiberg en 1964, (sólo en lo referente a las amebas, pues para los restantes taxones de los protozoos dicha clasificación ha sido ampliamente superada) las "Amebas Limax" se hallan incluidas en el Phylum *Protozoa*, Subphylum *Sarcomastigophora*, Superclase *Sarcodina*, Clase *Rhizopodea*, Subclase *Lobosia*, Orden *Amoebida*.

A partir del Orden *Amoebida* la clasificación en Familias ha sido, y sigue siendo, muy discutida. En 1970 los autores Singh y Das incluyen en este Orden tres familias: Familia *Endamoebidae*, cuyas especies son todas parásitas, (unas del hombre y otras de animales vertebrados e invertebrados), y las familias *Hartmannellidae* y *Schizopyrenidae* que comprenden especies parásitas y especies de vida libre que pueden, en ciertos casos, hacerse parásitas y aún patógenas. En estas dos familias podemos considerar incluidas las llamadas "Amebas Limax". Sin embargo, aún admitiendo la anterior distribución en Familias, el problema de ordenación taxonómica de éstos protozoos a nivel de géneros y especies sigue en pie, a pesar de los meticolosos y continuados esfuerzos que incansablemente realizan los especialistas. La mayor dificultad estriba en los diversos criterios que cada autor adopta y tiene en cuenta para su diferenciación taxonómica.

Unos autores toman como caracteres diferenciales de estos *Amoebida* la morfología y el aspecto general de las formas trofozoicas al microscopio de luz ordinaria, la formación y aspecto de los pseudópodos, la morfología de las fases quísticas, etc., etc.,

Otros autores (por ejemplo Wenyon en 1926), además de los datos morfológicos de trofozoítos y de quistes, tuvo también en cuenta la facultad que tienen algunas especies de producir o no, temporalmente y en determinadas circunstancias, cierto número de flagelos.

Más recientemente (Singh, 1952) utiliza criterios citogenéticos fijando su atención, por ejemplo, en que el nucleolo se divida o no al iniciarse la mitosis, o en que la membrana nuclear desaparezca o permanezca estable en igual fase de la reproducción mitótica. Con arreglo a estos caracteres diferenciales es como Singh estableció las diferencias en las tres familias que antes mencionamos, y de cuyas tres familias solamente en dos,

Schizopyrenidae y *Hartmannellidae*, comprenden "Amebas Limax", si bien por entonces aún no estaba bien conocida su acción patógena.

Permitiéndonos una simplificación para la clasificación de las "Amebas Limax", podemos exponer el siguiente cuadro siguiendo las directrices de Singh en 1952:

Familias	Géneros	Especies
Schizopyrenidae	Schizopyrenus	Sch. russelli
		Sch. erythaeusa
		Sch. atopus
Hartmannellidae	Naegleria	N. gruberi
	Didascalus	D. thortoni
	Hartmannella	H. glebae
		H. leptoneumus
		H. agricola

(En el anterior cuadro no están incluidas todas las especies conocidas).

Esta ordenación taxonómica, fue seguida durante muchos años por casi todos los especialistas, a pesar de que el criterio seguido se base en imágenes de la división mitótica (no siempre fáciles de observar y que obligan a mantener cultivos vivientes de tales amebas) y a que, según ciertos autores, los fenómenos de la mitosis no son constantes en todos los casos.

Otras muchas ordenaciones han sido propuestas en años sucesivos por distintos especialistas; Page, (en varias publicaciones desde 1965 a 1970), Kasprzak y Mazur (1972); Pussard (1972, 1973), etc. etc. Conviene sin embargo destacar que Kingston y Wahrust en 1968, atendiendo solamente a caracteres morfológicos, admiten las mismas dos familias *Schizopyrenidae* y *Hartmannellidae*, pero dentro del género *Hartmannella* incluye el subgénero *Acanthamoeba*, y que Page (1968), eleva a la categoría de género el subgénero *Acanthamoeba*; y más tarde Pussard (1972, 1973) crea para este

género la familia *Acanthamoebidae*, si bien algunos especialistas no han aceptado éstas, entonces nuevas, ordenaciones.

Con los escasos datos anteriores fácilmente puede verse que la ordenación taxonómica de las "Amebas Limax" no está resuelta, debido, principalmente a la falta de uniformidad en los criterios para seleccionar las características empleadas en las diferenciaciones taxonómicas, lo cual hizo a Pussard decir que la taxonomía de las "Amebas Limax" se encuentra en "un estado tal de desorden y confusión que es necesario acudir a nuevos caracteres que permitan distinguir, entre ellos, a éstos protozoos".

Facilmente puede comprenderse que en esta situación los conocimientos específicos que pueden tenerse de estos protozoos han de ser confusos y hasta contradictorios en ocasiones, ya que los estudios hechos por distintos investigadores no podrán ser comparables al no existir seguridad absoluta de que han trabajado con material biológico de igual naturaleza.

Recordemos a este propósito lo que anteriormente decíamos sobre la necesidad de mantener cultivos activos para determinar ciertas características diferenciales de las especies: es sabido que estos seres, de constitución bastante elemental, cambian su biología y su morfología según el medio en que se encuentren, pues bien, en uno de los trabajos realizados en el departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia y el Instituto López-Neyra de Parasitología del C.S.I.C., en 1976, se consignaban más de veinte medios de cultivos diferentes empleados por los distintos investigadores que se han ocupado de estos estudios.

Igual puede decirse de las técnicas de tinción, etc. etc., para las observaciones microscópicas.

No obstante las grandes dificultades que antes se reseñan para la correcta ordenación taxonómica, y precisamente por dichas dificultades, nos limitamos a consignar una relación de especies agrupadas dentro de los cinco géneros más conocidos, bien entendido que tal relación, por las causas descritas, no es una ordenación taxonómica ni completa ni perfecta, y solamente tiene un carácter provisional.

Familias	Géneros	Especies
<i>Schizopyrenidae</i>	<i>Schizopyrenus</i>	<i>S. russelli</i>
		<i>S. erythaenusa</i>
		<i>S. atopus</i>
	<i>Naegleria</i>	<i>N. fowleri</i>
		<i>N. gruberi</i>
		<i>N. aerobia</i>
	<i>Didascalus</i>	<i>D. thomtoni</i>
<i>Hartmannellidae</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>H. culbertsoni</i>
		<i>H. vermiformis</i>
		<i>H. agricola</i>
		<i>H. glebae</i>
		<i>H. limacoides</i>
		<i>H. exudans</i>
		<i>H. leptocnemus</i>
<i>Acanthamoebidae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>A. castellanii</i>
		<i>A. polyphaga</i>
		<i>A. rhyssodes</i>
		<i>A. radiosa</i>
		<i>A. hatchetti</i>
		<i>A. comandoni-astronyxis</i>

Debemos insistir en el carácter solamente aproximativo de la relación anterior, pues se han dejado de consignar varios géneros y especies, y, por otra parte, sobre algunas especies incluídas en los dos últimos géneros, no hay conformidad general en cual de ellos deben incluirse.

En todo caso, hemos de reconocer que cualquier clasificación que pudiera ser adoptada sería transitoria, al menos hasta que los estudios citogenéticos, inmunológicos y bioquímicos encaminados a la diferenciación específica no estén más desarrollados en el campo de estos protozoos.

Pese a lo dicho, y mientras esto sucede, no tenemos más remedio que aceptar las ordenaciones taxonómicas, y aún las nuevas especies que los especialistas propongan, siempre que las bases en que se fundamenten sean razonablemente demostrativas.

Distribución. Prácticamente pueden encontrarse amebas en todos los "hábitat" naturales en donde los seres vivos puedan existir; por ejemplo, en aguas, suelo, cadáveres de animales o plantas en descomposición e incluso pueden ser halladas en lugares en los que la vida está representada por sus más elementales y sencillas formas, (por ejemplo bacterias, de las cuales se nutren). Las amebas también, en algunas de sus numerosas especies, pueden hacer vida parasitaria, e incluso algunas de ellas están definitivamente adaptadas al parasitismo, con especificidad de hospedador más o menos estricta (por ejemplo, *Entamoeba histolytica* en el hombre y *Entamoeba invadens* en reptiles).

En el caso que ahora nos ocupa, las "Amebas Limax", ya quedó dicho que aun siendo "pequeñas amebas de vida libre", en determinadas circunstancias pueden convertirse en parásitas y hasta con elevado poder patógeno. En realidad, este hecho no debe ni puede sorprendernos grandemente, pues la más extendida opinión sobre el origen de los seres parásitos es que proceden de otras especies ancestrales que hacían vida libre. Esto nos sugiere una atractiva interrogante... ¿Estaremos asistiendo ahora, en estos siglos, con el caso de las "Amebas Limax" a uno de los infinitos casos de transformación de especies libres en especies parásitas? ... Asimismo se sabe que, en la mayoría de las infestaciones humanas, y en las experimentales en animales, presentan estas amebas un elevado índice de mortalidad, lo que viene, en cierto modo, a sugerir una respuesta afirmativa a la anterior pregunta, puesto que también es aceptado como cuestión general en parasitología, que en la adaptación completa parásito-hospedador se establece una cierta clase de equilibrio biológico de tal índole que aquél no tiende a destruir a éste, sino que ambos subsisten en convivencia, aunque con beneficio mayor o exclusivo para el primero, lo que debemos interpretar admitiendo que la extremada patogenidad de la infestación por "Amebas Limax" significa que todavía es una incompleta adaptación parasitaria.

Debemos además considerar el hecho de que las "Amebas Limax" producen quistes capaces de soportar condiciones muy desfavorables del medio ambiente, tales como la casi total desecación, la fuerte iluminación, cierto grado de elevación térmica, etc., por lo que pueden encontrarse, sin pérdida de viabilidad, en el polvo atmosférico del exterior y del interior de las viviendas, en la superficie de objetos de uso habitual, en el pelo, plumas y

piel de animales domésticos y salvajes, etc. etc. todo lo cual les facilita una enorme capacidad de dispersión; así pues, la presencia de las formas trofozoicas, (cuando se producen condiciones favorables en el medio) en los lugares más diversos, es prácticamente ilimitada.

Debemos puntualizar algo más la posibilidad de dispersión mencionando algunos de los hallazgos registrados en la bibliografía, limitándonos a las más interesantes denuncias de los últimos veinte años:

En Inglaterra, Kingston y Vahrsut (1961), encuentran quistes de *Hartmannella castellanii* en el aire de varias localidades, lo que permite a estos autores, empleando medios de cultivo adecuados, el aislamiento de las formas trofozoicas correspondientes.

Das, en 1970, descubre en tierras de jardín de varias localidades de la India las especies *Hartmannella culbertsoni* y *Naegleria aerobia*.

Un caso curioso fue el hallazgo realizado por Saygi en 1974, quien encontró en Turquía una especie del género *Acanthamoeba* en un suelo, bajo la nieve, a unos 2.000 metros sobre el nivel del mar. Mascaró, C.; Fluvia, M.C.; Guevara, D.C.; Osuna, A. y Guevara, D., han presentado en el IV Congreso Internacional de Parasitología (Varsovia, Agosto, 1978) una comunicación en la que, entre otras investigaciones, se da cuenta de haber encontrado una especie del género *Acanthamoeba* en torrentes de agua de deshielo de Sierra Nevada (Granada, España), tomadas las muestras a 1.700 y 2.400 metros de altitud.

Especies de los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba* fueron encontradas por Menapace y colaboradores en 1975 en muestras de suelo del estado de Colorado (USA).

Desde un punto de vista sanitario tiene gran importancia la presencia, casi constante, de diversas especies de "Amebas Limax" en piscinas destinadas al baño y al deporte, tanto en las dotadas con filtros y otras instalaciones depuradoras (sistemas de cloración) como en las carentes de dichas instalaciones. Asimismo se encuentran en lagos, ríos, pantanos, canales, etc.

que son utilizados con los mismos fines recreativos y deportivos que las piscinas. Mencionaremos algunos de las investigaciones a este propósito:

Chang, en 1972, encuentra diversas especies de "Amebas Limax" en piscinas de Cincinnati, en algunos afluentes del Mississippi, en aguas de suministro de una pequeña ciudad de California, en ciertos lagos de Florida y en el río Ohio.

En 1972, Kasprzak y Mazur hallan también "Amebas Limax" en las aguas de 22 lagos, un canal y un río de Polonia que fueron objeto de estudio; comprueban, experimentalmente, que dichas "Amebas" son patógenas para el ratón blanco cuando se le inoculan por vía intracerebral.

Un año después, en 1973, Jamieson y Anderson estudian en Australia las aguas de piscinas, depósitos, suministro doméstico, ríos, lagos, canales y fuentes termales. Logran aislar hasta 130 cepas de "Amebas Limax".

Červa y Haldt, en 1974, encuentran este tipo de amebas en cinco piscinas de Estocolmo, mientras que en el mismo año Jadin las descubre en los grifos de agua corriente de las salas de cirugía y en la que se tenía destinada para diálisis renal, lo que representa un caso de peligrosidad excepcional dentro de la enorme ubicuidad de estos protozoos.

También en 1974 Desmet-Paix denuncia que el 80 por ciento de las aguas de las piscinas por él investigadas en Bélgica están contaminadas por una o varias especies de "Amebas Limax".

Algo más tarde, Motet y colaboradores, en 1976, estudian, desde este punto de vista, las aguas de Estrasburgo destinadas al suministro de la ciudad, a piscinas y a otros usos y consiguen aislar hasta 72 cepas de varios géneros y especies de "Amebas Limax". Estos autores hacen observar que han encontrado estas amebas en todos los biotopos por ellos muestreados.

Kasprzak y Mazur también en 1976 investigan la presencia de estas amebas en aguas con temperaturas superiores a las normales, en lagos cuyas aguas se emplean en el enfriamiento de instalaciones industriales, y que alcanzan

hasta los 30 grados centígrados. De todos los lagos con estas características han podido aislar especies patógenas del género *Hartmannella* en Australia, Nueva Zelanda, India y Rusia. De aquí se desprende que aguas con temperaturas algo templadas son buenos biotopos para las especies patógenas de estas amebas. Eso mismo ya ha sido observado también en aquellas piscinas de baño o deporte con instalaciones de calefacción.

En lo que atañe a la presencia de "Amebas Limax" en aguas salinas señalaremos que Lasman, en 1977, encontró en las aguas marinas especies del género *Acanthamoeba*, y que Sawyer y colaboradores, en el mismo año, las encuentran en sedimentos oceánicos próximos a Nueva York y a Baltimore, comprobando experimentalmente que eran patógenas para el ratón blanco.

Resulta sorprendente el descubrimiento de Desmet-Paix en 1974 que encuentra "Amebas Limax" en aguas comercializadas y envasadas, tanto en las gaseosas como en las no gaseosas, siendo la presencia de las amebas independiente de la naturaleza del envase, vidrio, plástico o cartón parafinado.

Las únicas citas que hemos encontrado sobre investigaciones realizadas a propósito de la distribución de estas amebas en España, en los últimos años, aparte las investigaciones que se están llevando a cabo en Granada, que mencionaremos seguidamente, parecen ser las que realizaron Jadin y Willaert en 1974. Estos autores estudiaron aguas de distribución de 30 ciudades de varios países, sólomente cuatro de ellas no mostraron presencia de "Amebas Limax"; entre estas cuatro ciudades se cita a Barcelona.

En un trabajo realizado en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Granada y el Instituto López-Neyra de Parasitología, por los doctores Mascaró Lazcano, Fluvía Bru y Guevara Benítez, fueron muestreados 22 diferentes biotopos de Granada, Jaén y Valencia y de sus provincias respectivas (14 piscinas, con sistema depurador o sin él, tres fuentes naturales, dos charcas, un pantano, un pozo y un torrente). Fueron halladas varias especies de "Amebas Limax" en 21 de los biotopos estudiados. Los géneros y especies encontrados fueron los siguientes:

<i>Hartmannella vermiformis</i>	en 4 lugares
<i>Hartmannella glebae</i>	en 1 lugar
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	en 1 lugar
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	en 1 lugar
<i>Acanthamoeba</i> (sp.)	en 1 lugar
<i>Acanthamoeba</i> sp.	en 1 lugar
<i>Schizopyrenus</i> sp.	en 1 lugar
<i>Especies y géneros no identificados</i>	en 12 lugares

En un estudio anterior (1975-76) realizado por los doctores Mascaró, Guevara Benítez, y la licenciada de la Rubia Nieto, denuncian el hallazgo de una especie del género *Acanthamoeba*, que encontraron en los cultivos de algas del género *Oscillatoria*, mantenidos en el Instituto López-Neyra de Parasitología para la cría de *Limnaea truncatula* utilizadas a su vez en el ciclo biológico experimental de *Fasciola hepatica*. Dicha especie fue denominada provisionalmente *Acanthamoeba Gr.1* (dentro del complejo *Acanthamoeba comandoni-astronyxis*) la cual se mantiene en el Departamento de Parasitología por cultivos sucesivos en Bacto-Agar.

Lo expuesto hasta ahora en este apartado basta para demostrar la enorme dispersión de las "Amebas Limax", pero tenemos la casi absoluta seguridad de que serán muchos más los lugares en que se puedan encontrar, (desde las aguas marinas hasta los suelos nevados de altas montañas, pasando por las aguas termales, bien de fuentes naturales o producidas por la actividad tecnológica del hombre), ya que los estudios serios de estos interesantes protozoos han tomado un interés particular, entre los especialistas, solamente a partir del momento en que pudo demostrarse su acción patógena para el hombre de algunas, o tal vez de todas, las amebas de este grupo.

PATOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

Como en otros muchos casos de la investigación científica, parece que la acción patógena de las "Amebas Limax" se descubrió en experiencias que en un principio no estaban especialmente orientadas a su búsqueda:

Efectivamente, Jahnes, Fullmer y Li, en 1957, encontraron en sus cultivos de células de riñón de mono una contaminación por amebas que perjudicaban al cultivo ocasionando síntomas de degeneración celular; en el interior de algunas de estas células pudieron observar formas quísticas de amebas. Tales amebas fueron posteriormente identificadas como pertenecientes al género *Acanthamoeba*.

Varios investigadores más comprobaron también este tipo de contaminación en los cultivos celulares de distintos tejidos, atribuyéndola (creemos que acertadamente) a los quistes amebianos presentes en el aire, pero no consideraron más que su acción perjudicial para la marcha de sus cultivos celulares.

Parece que fueron Culbertson y sus colaboradores en 1958 quienes sospechando que la acción de las "Amebas Limax" en los cultivos celulares pudiera ser debida a algún virus presente en ellas, inyectaron intracerebralmente parte de los cultivos contaminados a monos y ratones. En todos los animales apareció una meningoencefalitis rápidamente mortal. En las necropsias fueron halladas numerosas amebas en las lesiones meníngeas y cerebrales.

Inoculaciones a ratones por vía nasal produjeron también meningoencefalitis mortales con presencia de amebas intracraneales. Estas experiencias repetidas posteriormente por muchos autores con iguales resultados sugieren que la vía intranasal sea una de las posibles formas de la infección natural en el hombre.

Trabajando Červa en 1967 con especies de "Amebas Limax" aisladas e identificadas en cultivos axénicos, e inoculando ratones con dosis de 105 individuos de *Hartmannella castellanii* intracranealmente, encuentra que el 40 por ciento de los animales murieron con síntomas de meningoencefalitis y presencia de amebas en el cerebro. Este autor también realizó inoculaciones análogas en ratas y cobayas.

En el mismo año de 1967, Wang y Feldman aislan *Acanthamoeba rhyodes* de gargantas humanas y tratan de averiguar si existe correlación entre la acción de esta especie sobre cultivos de células PMK y en inoculaciones a ratones. Aunque la acción sobre los cultivos no fue intensa, sí se originaron

lesiones granulomatosas con presencia de amebas en los cerebros de los ratones inoculados, si bien éstos no tuvieron síntomas de meningoencefalitis.

Culbertson, (1971) además de la instilación intranasal utiliza también la vía intravenosa para inoculación de amebas de los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba* a ratones y monos. Comprobó que, por la primera, se produce rinitis amebiana con posterior invasión de los bulbos olfatorios y del sistema nervioso central. También se producían lesiones y localizaciones del árbol respiratorio. Por la segunda vía, la intravenosa, se producía una invasión generalizada con neumonías amebianas y, ocasionalmente, encefalitis mortal. La inoculación intraperitoneal producía abscesos que curaban espontáneamente, sin diseminación generalizada ni meningoencefalitis.

Atendiendo a los resultados obtenidos por inoculación a animales de experimentación, Červa (1971) divide en seis grados crecientes la patogenidad de determinada cepa o especie de "Amebas Limax":

Grado I. Por inoculación intracerebral al ratón las amebas no son capaces de sobrevivir ni enquistarse en el cerebro.

Grado II. Por igual vía las amebas pueden sobrevivir y enquistarse en el cerebro, sin más perjuicio.

Grado III. Por igual vía las amebas sobreviven y se enquistan, pero además son capaces de matar al ratón.

Grado IV. Por instilación intranasal las amebas pueden penetrar en el cerebro, sobrevivir y enquistarse.

Grado V. Por instilación intranasal las amebas penetran en el cerebro y son capaces de matar al ratón.

Grado VI. Por instilación intranasal las amebas invaden el cerebro y pueden generalizarse a otros órganos.

Creemos que, aunque interesante, esta clasificación atendiendo a la patogenidad de las "Amebas Limax" sobre animales de experimentación, su interés es sólo relativo si se tiene en cuenta que en ella no figura la variabilidad individual del hospedador experimental que se utilice, y ya es bien sabido que la susceptibilidad puede ser extremadamente distinta, dentro de una misma especie, según la raza y hasta el individuo.

Wong, Karr y Balamuth, en 1975, utilizan una nueva vía de inoculación en animales de experimentación, en este caso en primates; esta vía es la intrarectal y la ameba estudiada fue la *Acanthamoeba culbertsoni*. Deducen estos autores de sus experiencias que existe una serie de factores que influyen en la patogenidad de las amebas. Entre estos factores, además de la susceptibilidad individual a que antes nos referíamos, se encuentra la clase y edad de los cultivos de donde se aislaron las amebas, las condiciones y el medio en que aquellas se mantienen, etc. etc. por lo cual cabe explicarse que, pese a la amplísima dispersión de estos protozoos, los casos humanos hasta ahora denunciados no son muy numerosos.

Kasprzak y Mazur, en comunicación presentada al IV Congreso internacional de Parasitología (Varsovia, Agosto, 1978) hacen referencia a un nuevo hallazgo, en 1976, de *Naegleria fowleri* en 6 lugares de aguas térmicamente polucionadas. Denuncian que en 9 lugares de un complejo lacustre investigaron barro de las riberas, encontrando "Amebas Limax", dos de cuyas cepas las identifican como *Naegleria fowleri*, pero no eran patógenas para el ratón por vía intranasal.

Guevara, D.C.; Batista, N.; Mascaró, M.C.; Osuna, A.; y Guevara, D. (1978). utilizan la estirpe de *Acanthamoeba Gr. 1* (nombre específico provisional), aislada en 1974 de los cultivos del alga *Oscillatoria sp.* del Instituto López-Neyra, conservada hasta la fecha en cultivos axénicos. Dicha *Acanthamoeba* demuestra su acción patógena sobre ratón albino cualquiera que sea la vía de inoculación, si bien los órganos más afectados están, hasta cierto punto, condicionados por aquella. Demuestran también que hay diferencias de susceptibilidad individual del hospedador.

Asímismo, ponen de relieve que la vía hemática de dispersión en el ratón se produce en periodos tardíos de la infección, que la *Acanthamoeba* investigada tiene preferencia por el pulmón más que por el cerebro¹. Dicha estirpe tiene cierta resistencia a la acidez del medio y a la acción lítica de la bilis "in vitro". Los autores deducen, por la patogenidad de la estirpe

1. Este resultado viene a confirmar lo denunciado en 1974 por Kasprza y colaboradores que encuentran cepas de *Acanthamoeba* patógenas para el ratón blanco por vía intranasal, siendo neumotropas que solamente causaban lesiones en pulmón.

estudiada, que puede incluirse en el grado IV de la clasificación de Červa. Las inoculaciones intrarrectales y las intraperitoneales ocasionan una dispersión de las amebas muy amplia, fijándose en muy variados órganos de los animales. (IV Congr. Intern. Parasitol. Agosto 1978).

También en 1978, en el IV Congreso Internacional de Parasitología, dan cuenta Stevens, Gallup, Jonckheere y Villaert de haber examinado al microscopio electrónico siete variedades de *Naegleria fowleri*, seropositivas, pero no patógenas, aisladas del medio ambiente, con objeto de observar si existían diferencias estructurales entre las cepas patógenas y no patógenas de ésta especie. Encuentran ciertas diferencias en la forma del núcleo, aspectos de la membrana nuclear, compacidad del retículo endoplasmático próximo al núcleo, entre otras. Los autores concluyen diciendo "posteriores resultados pueden revelar diferencias adicionales que puedan establecer que las variedades no patógenas sean una nueva especie de *Naegleria*".

Jonckheere, (1978), aisló del medio ambiente cepas de *Naegleria fowleri* no patógenas, que contrariamente a las patógenas no pudieron ser cultivadas en medio axénico. Estas "variedades" tuvieron siempre efecto citopatógeno sobre células Vero en cultivo. Se sabe que las cepas altamente patógenas pierden cierto grado de virulencia por subcultivos en medios axénicos, y por el contrario la virulencia puede ser aumentada mediante pases por cerebros de ratón o por siembras en cultivos de células Vero. Estos métodos, sin embargo, no inducen virulencia en las "variedades apatógenas".

Parece que existe en el hombre cierta inmunidad natural contra *Naegleria fowleri*, la cual puede también ser obtenida en el ratón por inmunización con *Naegleria gruberi*. Esto hace pensar que las "Amebas Limax" no patógenas pudieran tener importancia para la protección contra la Meningoencefalitis Amebiana Primaria, pero hay que determinar primeramente si las "variedades" no patógenas no pueden hacerse virulentas bajo ciertas condiciones.

Con la casuística anteriormente expuesta, sin haber hecho con ella un estudio exhaustivo, queda claramente demostrada la acción patógena de ciertas "Amebas Limax" en animales de experimentación, principalmente en el ratón blanco, asimismo se deduce que la gravedad de la amebiasis depende

de la vía de inoculación, de la especie, estirpe, raza, o individuos del parásito y también de la receptividad del animal empleado como hospedador. También diremos ahora que la presencia de bacterias en los cultivos mono o polixénicos de las amebas también tiene su influencia en la patogenicidad de estos protozoos, pero no siempre está bien estudiada y conocida esta cuestión.

Verdaderamente, el motivo principal del interés de estas amebas en la actualidad reside en su capacidad de infestar al hombre originándole parasitosis de elevada mortalidad.

La enfermedad más grave que ocasionan al hombre es, sin duda alguna, la MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA (MEAT).

La infestación humana por "Amebas Limax" fue primeramente denunciada por Butt, C.G. quien dió cuenta en la reunión de la Sociedad Americana de Parasitólogos Clínicos, celebrada en 1964, de dos casos fatales de Meningoencefalitis Amebiana Primaria, diagnosticados en Florida.

El periodo de incubación de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria es relativamente corto: entre 3 y 5 días según observaciones de Červa y colaboradores en 1968, Mandal y colaboradores en 1970, Duma y colaboradores en 1971, etc., etc.

Pasado el periodo de incubación la enfermedad se manifiesta con toda su espectacular sintomatología: cefaleas intensas, náuseas, vómitos; fiebre alta durante algún tiempo; rigidez de nuca; etc., etc. Seguidamente aparecen otros síntomas de encefalitis con delirio, convulsiones a veces, y parálisis general. Al estado febril sucede una hipotermia, sobreviniendo la muerte en pocos días por paro cardíaco. En algunos casos se ha observado también miocarditis.

Aunque la iniciación de los síntomas es generalmente súbita, algunos pacientes han mostrado síntomas precoces de infección del tracto respiratorio superior, con dolor de garganta y bloqueo nasal asociados comunmente a dolores de cabeza y fiebre.

Los parásitos se localizan en zonas relativamente estrechas de la sustancia gris del cerebro, en donde frecuentemente forman pequeñas cavidades por lisis del tejido, que contienen millares de amebas que están habitualmente acumuladas alrededor de los capilares. Butt y colaboradores encontraron en 1968 el mayor número de amebas localizado en la porción anterior de los lóbulos temporales y en los lóbulos olfatorios. Las formas trofozoicas de las amebas que allí se encuentran son redondeadas o aplanadas y miden de 12 a 15 micras de diámetro.

El número de leucocitos en sangre puede elevarse hasta 24.000 por milímetro cúbico, con el 92 por ciento de neutrófilos y el siete por ciento de linfocitos. Pueden encontrarse también amebas móviles.

Las historias clínicas de los pacientes diagnosticados de Meningoencefalitis Amebiana Primaria casi siempre demuestran que el enfermo tuvo relación con piscinas, lagos y otros lugares dulceacuícolas, bien en forma de baños, abluciones o simples contactos parciales con las aguas en las que luego pudo demostrarse la existencia de alguna de las especies de "Amebas Limax". Estos datos, junto a los que nos suministra la infestación experimental de animales, dan valor a dos condiciones epidemiológicas de interés en sanidad humana: que las "Amebas Limax" abordan al hombre vehiculizadas por aguas de piscinas, ríos, etc.; que el lugar preferente de penetración es la mucosa nasal, sin descartar otras vías de posible entrada menos frecuentes o menos estudiadas.

Es indudable que la temperatura templada favorece la multiplicación y vitalidad (y consecuentemente la capacidad de penetración en su hospedador) de las formas trofozoicas de "Amebas Limax", por lo que en las piscinas climatizadas su pululación es mayor y más peligrosa que en las de aguas frías. Cercova y colaboradores en 1972 llegaron a contar hasta un millón de amebas por litro de agua de una piscina de este tipo, y precisamente a la salidad del filtro de depuración.

Hasta la hora presente son más de un centenar los casos seguros de Meningoencefalitis Amebiana Primaria que se han denunciado en todo el mundo. Consignaremos algunos ejemplos de casos interesantes de diferentes

lugares, en los que se encuentran datos que confirman lo anteriormente dicho:

Červa y Novak en 1968 encontraron "Amebas Limax" en las aguas de un río de las que se abastecía una piscina en la que se presentaron 16 casos mortales de Meningoencefalitis Amebiana Primaria.

Jamieson en 1973 encontró especies de "amebas Limax" en una fuente de agua termal de Nueva Zelanda en la que estaba implicado un caso de Meningoencefalitis por el uso personal de aquellas aguas.

Vandepitte y colaboradores estudian en 1974 las aguas de un riachuelo belga y aíslan de ellas una cepa de *Naegleria fowleri*; esta misma ameba la encuentran los autores en el líquido cefalorraquídeo de un niño fallecido a los pocos días de haberse bañado en dicho río.

En 1974 hace Willaert una recopilación de los casos de Meningoencefalitis Amebiana Primaria denunciados hasta aquella fecha. Recoge 84 casos con 74 defunciones (debemos señalar que los diagnósticos etiológicos más exactos y seguros han sido los verificados en autopsias, con aislamiento y cultivo para identificación de las amebas). Los casos registrados procedían de Norteamérica, Sudamérica, La India, Bélgica, Checoslovaquia, Inglaterra, Irlanda del Norte, Australia, Nueva Guinea y Nueva Zelanda.

Además de los casos de Meningoencefalitis Amebiana Primaria, se conocen afecciones por "Amebas Limax" de otras localizaciones; por ejemplo la queratitis ocular crónica de un granjero adquirida, sin duda alguna, por lavarse los ojos con agua de un grifo donde se encontró la misma especie de ameba del género *Acanthamoeba* que ocasionaba la enfermedad, según Visvevara (1975).

En 3.082 exámenes de frotis de mucosas nasales de soldados (sin ninguna afección manifiesta) encontraron Červa y colaboradores en 1973, que el 7 por ciento eran portadores de quistes de "Amebas Limax". Estos mismos quistes fueron también hallados en el polvo de las habitaciones del cuartel, y plantea la cuestión de portadores sanos. Otros hallazgos en líquidos orgánicos y en excreciones que podemos citar son: En una otitis crónica de un niño

Jakvjevich y Talis en 1969, encontraron quistes y trofozoítos de una ameba del género *Hartmannella*; en las mucosas nasales de individuos afectados de rinitis y cefaleas (Skocil y colaboradores 1970); en esputos humanos, (Wang y Feldman, 1961 y 1967); en heces humanas y de animales domésticos; etc., etc. También se han encontrado en órganos y tejidos de diversos animales, bien de manera espontánea o en infestaciones experimentales.

Por otra parte, y ante la dificultad del diagnóstico etiológico de esta parasitosis, podemos atrevernos a afirmar, con pocas probabilidades de error, que muchas de las meningoencefalitis mortales denominadas "estériles" debido a la ausencia de gérmenes bacterianos en el líquido cefalorraquídeo, así como las consideradas de "etiología desconocida" serán muy probablemente ocasionadas por alguna de las especies de "Amebas Limax".

Debemos también consignar que éstas pueden servir de vehículo para otros agentes infecciosos, tales como bacterias y virus. Así parece deducirse de los estudios al microscopio electrónico realizados por Schuter en 1969, y por este mismo autor en colaboración con Dunnebacke en 1974. Incluso hay autores que sostienen el criterio de que la penetración de las amebas por la mucosa nasal está favorecida, y hasta condicionada, por la presencia de agentes microbianos.

Hemos podido ver, a lo largo de lo expuesto, la gran difusión que las "Amebas Limax" tienen sobre la superficie de la Tierra, en tantos lugares en los que el hombre vive, y sin embargo los casos de Meningoencefalitis hasta ahora registrados son relativamente escasos.

¿Qué respuesta cabe dar a esta aparente contradicción? Resulta difícil dar una explicación simplista; probablemente porque las razones son muy diversas y su interacción muy compleja. Podemos sugerir algunas de ellas, sin agotar, desde luego, todas las posibilidades: porque, siendo el diagnóstico de las amebiasis difícil y hasta cierto punto complicado, no todas las afecciones humanas producidas por ellas se llegan a diagnosticar; porque tratándose de una infección no muy frecuente, raramente piensa el clínico en ella, no solicitando del laboratorio su investigación; porque no todas las estirpes, cepas y aún especies de las "amebas Limax" son patógenas; porque la forma más espectacular y trágica de esta parasitosis es la Meningoencefalitis

Amebiana Primaria, y ésta parece que solamente se produce cuando la infección se adquiere por vía de la mucosa nasal, nervio olfatorio y por fin cerebro; porque la virulencia de determinada cepa de ameba debe ser lo suficientemente elevada como para producir sintomatología espectacular.

A este último propósito debemos señalar que Jadin en 1973 ya plantea el problema de la variabilidad de virulencia de las "Amebas Limax". Comprueba que cepas aisladas de casos de Meningoencefalitis conservan e incluso aumentan su virulencia por pases sucesivos en animales de experimentación. Igualmente comprueba que una cepa de *Naegleria* patógena para el hombre conserva su virulencia para los animales por pases sucesivos intracraneales en ratas, pero que dicha cepa no se comporta en cultivos como las que se aíslan directamente de un caso de MEAP. Recuerda la repetición de hasta 16 casos mortales procedentes de una misma piscina, todo lo cual hace pensar a dicho autor que la conservación y tal vez el aumento de la virulencia para el hombre esté condicionado por contactos sucesivos de las amebas con sustancias antigénicas humanas; tales sustancias se puede suponer hipotéticamente que sean los desechos humanos de descamación de piel y bordes de orificios naturales cuyos exudados y desechos sirven de alimento a las amebas en las piscinas.

Los investigadores neozelandeses Cursons, Brown y Keys dieron cuenta en el IV Congreso Internacional de Parasitología (Agosto 1978) de haber estudiado la correlación que existe entre la patogenicidad de cepas de *Naegleria fowleri* y de *Acanthamoeba culbertsoni* y la producción de fosfolipasa A. Los resultados demuestran, a juicio de estos autores, que las cepas patógenas producen más cantidad de fosfolipasa A que las no patógenas. Asimismo han realizado tests inmunológicos entre la población humana de Neo Zelandia (recordemos que allí se dieron en 1975 siete casos de Meningoencefalitis Amebiana Primaria, y que se han encontrado "Amebas Limax" en numerosas piscinas termorreguladas). Los resultados demostraron que sueros humanos recientes no calentados contenían algún anticuerpo natural específico capaz de neutralizar a la *Acanthamoeba culbertsoni* pero no a la *Naegleria fowleri*, ello tiende a explicar la baja incidencia de la enfermedad, pese a la frecuencia de las amebas.

Janitsche, K. (IV. Congr. Int. Parasitol., Vars. Agosto 1978), comunica haber

hecho siembras de *Naegleria* (TY/Richmond) en aguas de piscinas a 25 y a 35° C. con 0.8 mg./l. de cloro. Solamente consigue resiembras de las amebas en el 25 por ciento de las muestras. De aquí deduce que tales aguas parecen ser desfavorables para el crecimiento de *Naegleria*.

Realizó también investigaciones en piscinas termorreguladas, interiores, de Berlín, "ninguna de las cuales tenía acceso directo al medio ambiente exterior". Pudo cultivar diferentes cepas de "Amebas Limax", "pero hasta ahora ninguna se ha convertido en patógena", (no se menciona en los "proceeding" las especies de amebas, ni los medios de cultivo, ni los animales y métodos seguidos en la determinación de la patogenicidad).

Gordeyeva, L.M. en el mismo Congreso de 1978, da cuenta de sus trabajos investigando la acción citopatógena de "Amebas Limax", observada en cultivos de tejidos. Trabaja con dos cepas de *Acanthamoeba* extraídas en broncoscopias de un paciente de neumonía crónica y otro de atelectasia de etiología no clara; ambas fueron cultivadas axénicamente en medio líquido con trypton y suero bovino. Cultivos de células HeLa y de fibroblastos de embrión de pollo fueron inoculados con las amebas; las células HeLa son más sensibles a la citopatogenicidad de las *Acanthamoeba* spp. Comprueba que la acción citopatógena se produce como resultado de la presencia conjunta de células HeLa o fibroblastos y las amebas mismas, ya que filtrados de cultivos de amebas no tenían acción citopatógena alguna.

Ockert, G. y Leue, G. en el mismo congreso de 1978, dan cuenta de haber encontrado tres casos de amebas en vías respiratorias humanas entre 170 pacientes, a los que se practicó lavado tráqueo-bronquial con agua. En dos casos las amebas fueron identificadas como del género *Hartmannella* y el tercero pertenecían al género *Naegleria*. No encontraron una relación directa entre la presencia de las amebas y las lesiones o síntomas pulmonares. No obstante, la cita tiene interés epidemiológico, ya que demuestra la presencia de "Amebas Limax" en vías respiratorias que en otros posibles casos sí que pudieran demostrar su patogenicidad.

DIAGNOSTICO.

Según Craig y Faust, la sintomatología de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria se asemeja a la de meningitis bacteriana fulminante, pero el líquido cefalorraquídeo es menos purulento, presenta mayor número de mononucleares y los niveles de proteínas y de glucosa son más elevados.

Las amebas están presentes en el líquido cefalorraquídeo, pero son difíciles de identificar, ya que no pueden reconocerse en los frotis de sedimento teñidos por el Gram, que es la tinción habitual. En el examen en fresco del sedimento pueden verse las formas móviles amebianas, pero es fácil interpretarlas como macrófagos en movimiento; a menos que de antemano se sospeche la infección amebiana, lo más probable es que pasen desapercibidas.

La mayor parte de los diagnósticos que hasta ahora se han realizado con absoluta seguridad fueron hechos en autopsias, investigando las amebas en los exudados purulentos, zonas necróticas y espacios perivasculares en cerebro y otras localizaciones como pulmón, hígado, corazón y bazo.

En el amplísimo trabajo de Eddy Willaert en 1976, que constituyó su Tesis Doctoral, se hace un detallado estudio inmunológico de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* y, aunque orientado de una manera especial a la ordenación taxonómica de las especies de ambos géneros, es indudable que los resultados por él obtenidos representan una importante base orientativa para su aplicación al diagnóstico inmunológico de las enfermedades producidas por estas amebas.

Numerosos trabajos se llevan a cabo desde hace años, y más aún si cabe en el presente, para la identificación inmunológica específica de las "Amebas Limax" pero su aplicación a los análisis de rutina para el diagnóstico está todavía poco extendida.

En 1977 Červa¹ publica una detallada descripción del test de hemoaglutinación indirecta para detectar anticuerpos específicos contra

1.Červa, L. 1977. Detection of Antibody Against Limax Amoebas by Means of the Indirect Haemagglutination Test. Folia Parasitologica (Praga), 24: 293-299.

amebas patógenas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Afirmar que los reactivos se conservan bien por liofilización lo que facilita la estandarización del método, y manifiesta gran uniformidad antigénica para *Naegleria fowleri* y acusadas diferencias con las especies de *Acanthamoeba*.

Julio Martínez, en 1978, en su comunicación al IV Congreso Internacional de Parasitología, se ocupa de este tema y opina que "el diagnóstico histológico de las infecciones por especies de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* no es difícil, siempre que el patólogo tenga la sospecha de la etiología amebiana".

Efectivamente, algunos casos diagnosticados sintomatológicamente, lo fueron porque el patólogo fue informado de que el paciente se había bañado en piscinas en las que ya se habían dado casos anteriores de Meningoencefalitis Amebiana Primaria.

También puede servir de orientación, aunque es muy dudoso que se presente la oportunidad de ponerlo en práctica, el hallazgo de quistes o trofozoitos en el exudado traqueal o bronquial de personas con molestias más o menos acusadas en las vías respiratorias; pero si esto sucede, la iniciación de los síntomas meningoencefálicos que puedan presentarse posteriormente dan una orientación bastante segura.

En cuanto a la determinación específica de cada uno de los posibles agentes amebianos, tanto para diagnóstico clínico como para investigaciones epidemiológicas en piscinas y otros lugares de posible contagio, la cuestión es mucho más complicada y difícil. No podemos entrar en detalles de las técnicas empleadas, entre otras razones porque dentro de su complicación cada autor prefiere particularmente una diferente; pero basta que hagamos una breve enumeración de las operaciones generalmente necesarias: (según se realiza en nuestros laboratorios).

- Toma de muestra y transporte asépticamente practicados.
- Tratándose de aguas, agitación prolongada.
- Filtración por filtro calibrado de 1'2 micras.
- Lavado del residuo retenido sobre el filtro, y su siembra.
- Siembra por impresión del filtro invertido, (ambas siembras por separado y en agar no nutritivo, durante 48 horas).

- Comprobación del crecimiento del cultivo.
- Tratamiento por antibióticos, para eliminar bacterias asociadas.
- Siembras en medios nutritivos específicos, a 37° C.
- Aislamiento definitivo de distintas especies en medios líquidos y axénicos.
- Identificación de la especie por sus caracteres peculiares.

Para el cultivo de "Amebas Limax" a partir del sedimento del líquido cefalorraquídeo de los pacientes, Červa ha elaborado un medio de cultivo que está constituido por una fase sólida de agar nutritivo inclinado cuya superficie está recubierta de suspensión espesa de *Aerobacter aerogenes* calentados a 65° C. durante 30 minutos.

La siembra se realiza dejando resbalar unas gotas del líquido cefalorraquídeo sobre la capa de *Aerobacter aerogenes*, y luego se incuba a 37° C. durante una semana.

Facilmente se comprende que siendo la evolución de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria tan rápida (de tres a siete días después de la infección sobreviene la muerte en los casos agudos), esta técnica solamente será aplicable para el diagnóstico en los casos humanos en que la multiplicación amebiana no sea excesiva o en los que la virulencia de la cepa está disminuída, o en aquellos otros en que los anticuerpos naturales ejerzan su influencia un tanto protectora, por lo que la enfermedad no fuera rápidamente mortal, prolongándose lo suficiente para dar tiempo al resultado del cultivo.

En algunos centros hospitalarios se sigue ya la costumbre de investigar sistemáticamente en toda punción lumbar, no solamente los análisis específicos para los que fue prescrita, sino también la búsqueda de "Amebas Limax", bien por examen directo o mediante cultivo.

La correlación advertida entre la implantación de esta norma y el hallazgo de casos humanos de MEAP ha movido a grupos internacionales de expertos a recomendar dicha práctica para todos los laboratorios de análisis microbiológicos y parasitológicos de las instituciones hospitalarias. Es deseable que tales recomendaciones sean también seguidas en los centros de nuestro país.

TERAPEUTICA.

En cuatro principales líneas de investigación pueden agruparse las técnicas seguidas por los diferentes autores para estudiar la acción amebicida y curativa de los posibles agentes terapéuticos:

- a). En cultivos axénicos "in vitro" de cepas de las diferentes especies de "Amebas Limax".
- b). En cultivos "in vitro" de células, en los que se inocula la cepa o especie de "Ameba Limax" a estudiar, y posteriormente el agente terapéutico.
- c). En ratones blancos inoculados con la ameba en cuestión, a los que se administraba la droga.
- d). En personas afectadas de Meningoencefalitis Amebiana Primaria, en tratamientos con propósitos curativos.

Las líneas a) y b), son indudablemente las que permiten repetición y control de resultados más fácilmente asequibles, y en donde se pueden variar con mayor independencia los parámetros elegidos para su estudio; pero tienen la desventaja grande de no ser equiparables los resultados a la "acción curativa" de la droga ensayada, aunque pueda establecerse cuáles son los agentes terapéuticos de mayor efecto lesivo para las amebas. Por lo que las experiencias "in vitro" no suelen ser las mejores para este tipo de estudios.

La línea c), tiene la ventaja de hacerse las valoraciones "in vivo", en el ratón experimentalmente infestado, pero tiene dos inconvenientes menores: que los resultados en ratón no son enteramente superponibles a los que puedan producirse en el hombre; y que para la infestación de ratones se tiene que disponer de cultivos, que ya se dijo anteriormente hacían cambiar de gran manera la patogenidad y la virulencia de las especies cultivadas.

Queda solamente como línea de mayor rigor científico la d), pero ésta no es posible más que en contados casos, y de ninguna forma en infestaciones experimentales; por lo que el investigador tiene que recurrir a cualquiera de las tres primeras, con todos sus inconvenientes.

Entre estos inconvenientes cuentan, según nos enseña la bibliografía consultada, las grandes diferencias de resultados obtenidos por los distintos autores que se ocuparon de este estudio.

Se han ensayado por uno u otro método varias decenas de agentes terapéuticos, entre antibióticos, antipalúdicos, antiamebianos, etc. etc. con resultados tan variados y dispares que resulta imposible obtener consecuencias aprovechables para el tratamiento.

No obstante lo dicho, parece ser que, hasta el momento, el único producto que aunque sin absoluta seguridad, es el que mejores resultados dio ha sido la ANFOTERICINA - B.

Este fungicida tiene indeseables efectos secundarios en el hombre, a veces graves, por lo que su administración ofrece dificultades, según demostraron Goodman y Gilman, en 1970.

Después de lo dicho es indudable que se necesitan más extensos y más profundos estudios sobre las "Amebas Limax", desde el punto de vista de su epidemiología y de su patología en el hombre, y muy especialmente sobre su terapéutica.

Habiéndose demostrado en el ratón blanco que su infección subletal con determinada especie de "Ameba Limax" engendra anticuerpos defensivos contra la misma especie y contra especies vecinas, cabe pensar que ésta pudiera ser la base inmunológica de una eficaz terapéutica contra la Meningoencefalitis Amebiana Primaria en el hombre. En cualquier caso, se considera indispensable una más amplia y profunda labor investigadora en este campo de la Parasitología.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLENFIEF, A., 1912. Sur les caracteres cytologiques en la systematique des amibes du groupe limax. (*Naegleria* nov. gen.) et ds amibes parasites des vertebrés, (*Proctamoeba* nov. gen.). Bull. Soc. Zool. Fr. 37: 55-74.
2. ARMSTRONG, J.A. y PEREIRA, M.S. 1967. Identificación of "Ryan Virus" as an Amoeba of the Genus *Hartmannella*. Brit. Med. J. i 212-214.
3. BAND, R.N., 1962. The aminoacid requeriments of the soil amoeba *Hartmannella rhysodes*. Singh. J. Protozool. 9: 377-9.
4. BAND, R.N., 1963. Extrinsic requeriments for encystation by the soil amoeba *Hartmannella rhysodes*. J. Protozool. 10: 101-106.
5. BAND, R.N. y MOHRLOK, S. (1969). The respiratory metabolism of *Acanthamoeba rhysodes* during encystation. J. Gen. Microbiol., 59: 351-8.
6. BOCZON, K; ADAS, E. y KASPRZA, W. 1978. Comparative Enzymatic Studies on Pathogenic and Nonpathogenic Strains of Free Living Amoebae. Proc. IV International Congress of Parasitology, Varsovia, Agosto, 1978, Sect. F: 3, p. 35.
7. BORTOLINI, G. y STOCCHI, F., 1958. Nuove osservazioni sull *Hartmannella castellanii*, 1930. Archivio Italiano Scienze Mediche Tropicali, 39: 173-184.
8. BOVEE, E.C., 1963. Studies concerning the effects of nutrition on morphology of amebas. *Acanthamoeba castellanii* Douglas on abundant and starvation quantities. Am. Midl. Nat. 66: 173-181.
9. BOWERS, B. y KORN, E.D., 1968. The fine estructure of *Acanthamoeba castellanii* I. The trophozoite. J. Cell. Biol. 39: 95-111.
10. BOWERS, B. y KORN, E.D., 1969. The fine estructure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain) II. Encystament. J. Cell. Biol. 41: 786-805.
11. BUTT, C.G. 1966. Primary Amebic Meningoencephalitis. New Engl. J. Med., 274, 1473-1476.

12. BUTT, C.G. 1968. The Pathology of Amebic Encephalitis. *Bull. Path.*, **9**, 83.
13. BUTT, C.G., BARO, C., y KNORR, R.W. 1968. *Naegleria* sp. Identified in Amebic Encephalitis. *Amer. J. Clin. Path.* **50**, 568-574.
14. BYERS, T.J., RUDICK, V.L. and RUDICK, H.J., 1969 Cell size, Macromolecule and cyst formation during two growth phases in unagitated cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.* **16**: 693-699.
15. CALKINS, G.N., 1933. The biology of Protozoa. London: Bailliere, Tindall y Cox.
16. CALLICOTT, J. H. Jr. 1968. Amebic Meningoencephalitis Due to Free Living Amebas of The *Hartmannella (Acanthamoeba) Naegleria* Group. *Amer. J. Clin. Path.* **49**, 84-91.
17. CALLICOTT, J.H. Jr., Nelson, E.C., Jones, M.M., dos Santos, J.G.Utz, J.P., Dumas, R.J. y Morrison, J.V., Jr., 1968. Meningoencephalitis Due to Pathogenic Free-Living Amoebae. Report of Two Cases. *J. Amer. Med. Assoc.*, **206**, 579-582.
18. CANNON, R. E., SHANE, E. Dc., MICHELE, ASCE, 1974. *J. Environ. Eng. Div. 100 (EEG)*. 1205. (citado por Sawyer, 1977).
19. CAPRON, A.; BIQUET, J.; VERNES, A. y AFCHAIN, D. (1968). Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.*, **16**: 121-138.
20. CAROSI, G., 1974. Etude comparative de l'ultrastructure d'*Entamoeba moshkovskii* des amibes parasites du genre *Entamoeba* et des amibes "free living" du groupe *Hartmannella-Naegleria*. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* **54**: 265-277.
21. CARTER, R., 1968. Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J. Pathol. Bacteriol.* **96**: 1-25.
22. CARTER, R.F., 1970. Description of a *Naegleria* species isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Path.* **100**: 217-244.
23. ČERVA, L. (1967). Intracerebral inoculation of experimental animals in pathogenetical studies of *Hartmannella castellanii*. *Folia Parasitol. (Praha)* **14**: 207-215.
25. ČERVA, L. y NOVAK, K. (1968). AMOEBIC MENINGOENCEPHALITIS: sixteen fatalities. *Science*. **160**: 92.
26. ČERVA, L., NOVAK, K. y CULBERTSON, C.G., 1968 An outbreak of acute, fatal amoebic meningoencephalitis. *Amer. J. Epidem.* **88**: 444-466.
27. ČERVA, L., 1970. Growth of pathogenic A₁ strain *Acanthamoeba castellanii* in the chick embryo. *Folia Parasitol. (Praha)* **17**: 315-318.
28. ČERVA, L., 1971. Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain vitek. *Folia Parasitologica (Praha)* **18**: 171-176.

29. ČERVA, L., 1971. Studies of limax amoebae in a swimming pool. *Hidrobiologia* **38**: 141-161.
30. ČERVA, L., SREBUS, C. y Skocil, V., 1973. Isolation of Limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol. (Praha)* **20**: 97-103.
31. ČERVA, L., HULDT, G., 1974. Limax amoebae in five swimming pools in Stockholm. *Folia parasitologica*, **21**, (7) 71-75.
32. CER/OVA, H., CERVA, L., MACK, J. y JOHNOVA, V., 1972. Quantitative follow up study of the frequency of limax group amebas in the Podok swimming pool. *Čs. Epidem.* **21**: 203-210.
33. GRAG Y FAUST. 1970. *Clinical Parasitology*, Lea & Febiger, Philadelphia, 8^a Ed. pp. 171-175.
34. CULBERTSON, C.G., SMITH, J. y MINNER, J., 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science*, **127**: 1506.
35. CULBERTSON, C.G., SMITH, J.W., COHEN, H. K., y MINNER, J.R. 1959 Experimental Infection of Mice and Monkeys by *Acanthamoeba*. *Amer. J. Path.*, **35**, 185-197.
36. CULBERTSON, C.G., 1961. Pathogenic *Acanthamoeba (Hartmannella)*. *Am. J. Clin. Pathol.* **35**: 195-202.
37. CULBERTSON, C.G., HOLMES, D.C. y OVERTON, W.M. 1965. *Hartmannella castellanii (Acanthamoeba sp.)*. Preliminary Report on Experimental Chemotherapy. *Amer. J. Clin. Path.* **43**, 361-366.
38. CULBERTSON, C.G., ENSMINGER, P.W. y OVERTON, W.M. 1965. The isolation of additional strains of pathogenic *Hartmannella sp. (Acanthamoeba)* Proposed culture method for application to biological material. *Am. J. Clin. Pathol.* **43**: 383-387.
39. CULBERTSON, C.G., ENSMINGER, P.W., y OVERTON, W.M. 1968. Pathogenic *Naegleria* sp. Study of a Strain Isolated from Human Cerebrospinal Fluid. *J. Protozool.*, **15**, 353-363.
40. CULBERTSON, C.G., 1970. Pathogenic free-living amebas. *Industry and Trop. Health.* **7**: 118-23.
41. CULBERTSON, C.G. (1971). The pathogenicity of soil amoebae. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**: 235-4.
42. CURSONS T.M.; BROWN, J. y KEYS, ELIZABETH. 1978. The Epidemiology of Primary Amebic Meningo-Encephalitis in New Zealand. Proc. IV. International Congress of Parasitology, Sect. A. p. 27. Vsovia. Agosto 1978.
4. CHAKRAVARTY, M.M. y HALDAR, D.P. 1966. Morphological and cytological observations on a soil amoeba *Hartmannella* sp. *J. Protozool.* **13**: (Abstracts) pg. 25.
4. CHANG, S.L., 1971. Small free-living amoeba: Cultivation, quantitation, identification, assification, pathogenesis and resistance. *Curr. Trop. Comp. Pathobiol.* **1**: 201-54.

45. CHANG, S.L., 1972. Pathogenic free-living amoebae and recreational waters. Proc. Water Pollution Research. (Israel) 13: 1-12.
46. CHANG, S.L., KABLER, K.W., y WOODWARD, R.L., 1960 Survey of free-living nematodes and amoebas in municipal supplies. J. Am. Wtr. Wks. Assoc. 52, 613-618.
47. DAS, S.R., 1970. Virulence and identification of free-living soil amoeba of the *Naegleria-Hartmannella* type. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 64, 20.
48. DAS, S.R., 1974. Isolation of *Naegleria* and *Hartmannella* amoebae from Beckenham, (London) soils and their pathogenicity in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 663-664.
49. DAS, S.R., 1974. Importance of appropriate techniques for various studies on small free-living amoebae and their bearing on the taxonomy of the order *Amoebida*. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54: 235-247.
50. DEMEREAUX Y COLS, 1974. Action du chlore sur les amibes de l'eau. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54.
51. DESMET-PAIX, L., 1974. Recherche systematique d'amibes dans les eaux de piscines et les eaux minerales. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54: 409-414.
52. DINGLE, A. D., 1967. Evidence for a temperature sensitive control over flagellum development in transforming cells of *Naegleria gruberi*. J. of Protozool. 14, 12.
53. DOLPHIN, W.D., 1968. Inhibition of the reproductive rate of *Acanthamoeba* sp. by intense continuous visible light. J. Protozool. 15: Abstract. 82.
54. DUMA, R.J. RESEBLUM, W.L. Mc. GEHEE, R.F., JONES, M.M y NELSON, E.C., 1971. Primary amoebic meningo-encephalitis caused by *Naegleria*. Ann. of Int. Med. 74: 923-931.
55. DUNNEBACKE, T.H., y Schuster, F.L., 1974. An infections agent associated with amoebas of the genus *Naegleria*. J. Protozool. 21. (2), 327-329.
56. FOWLER, M., y CARTER, R.F. 1965. Acute Pyogenic Meningitis Probable Due to *Acanthamoeba* sp. A preliminary Report. Brit. Med. J., 2, 740-742.
57. GORDEYEVA, L.M 1978. Amoebae of Limax-Group from the Respiratory Tract of Man: Interactions with Cell Cultures. Proc. IV International Congress of Parasitology. Varsovia, Agosto, 1978, Sect. A, p. 34.
58. GRIFFITHS, A.J. y HUGUES, D.E., 1961. The physiology of encystment of *Hartmannella castellanii*. J. Protozool. 16: 93-99.
59. GRIFFITHS, A.J., ROACH, G.J. y HUGUES, D.E., 1966. Early stages in the encystment of *Hartmannella castellanii*. J. Protozool. 13: 31.
60. GRIFFITHS, A.J. y HUGUES, D.E., 1967. The physiology of the encystment of *Hartmannella castellanii*. Neff. J. Protozool. 14: 40.

61. GUEVARA-BENITEZ, D.C.; BAUTISTA-DIAZ, M.N.; MASCARO LAZCANO, M.C. y OSUNA-CARRILLO, A.; y GUEVARA, D. 1978. Pathogenic Capability of *Acanthamoeba* sp on White Mice. Rev. Ibér. Parasitol. (En prensa). Proc. IV International Congress of Parasitology. Varsovia, Agosto, 1978.
62. GUEVARA-BENITEZ, D.C.; MASCARO-LAZCANO, M.C. y FLUVIA-BRU, M.C. 1978. Presencia de amebas del grupo "Limax" en distintas colecciones de agua dulce. Rev. Ibér. Parasitol. (En prensa).
63. HALDAR, D.P. y CHAKRAVARTY, M.M., 1967. Some cytochemical observations on *Hartmannella* sp. Isolated from a local soil sample. J. Protozool. 14: 34.
64. International colloquium on primary amoebic meningo-encephalitis and free-living amoebae. Anales de la Soc. Belge de Med. Trop. 54: 4-5.
65. ITO, S., SHIHMAN, C. y POLLARD, T. D., 1969. Cytoplasmic distribution of DNA in a strain of *Hartmannella* amoeba. J. Protozool. 16: 638-645.
66. JADIN, J.B. (1973). Hypotheses au sujet de l'adaptation des amibes du groupe limax a l'homme et aux animaux. Ann. Parasitol. h.C. 48: 199-204.
67. JADIN, J.B., 1974. Les amibes dans les eaux. Path. Biol. 22: 81-87.
68. JADIN, J.B., 1974. De la dispersion et du cycle des amibes libres. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54, 4-5.
69. JADIN, J.B., VAN MAERCKE, Y. y STEVENS, W. (1971). Trois cas de meningoencephalite amibienne primitive observés a Anvers (Belgique). Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 51: 255-266.
70. JADIN, J.B., WILLAERT, E., 1974. De la necesité du controle biologique des eaux de consommation. In Third International Congress of Parasitology. Proceedings. Vol. 1, 186 Facta publication.
71. JADIN, J.B. y WILLAERT, E. (1976). Isolement d'"amibes libres" a partir du mucus nasal des lépreux. J. of Protozool. 23 (4). 12 A. (Abstracts).
72. JAHNES, W.G., FULLMER, H.M., y LI, C.P., 1957. Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96: 484-488.
73. JAKOVLJEVICH, R. y TALIS, B., 1969. Recovery of a *Hartmannelloid* amoeba in the purulent discharge from a human ear. J. Protozool. 16: (suppl. 36).
74. JAMIESON, A., 1973. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in South Australia. Progress in Protozoology (Clermont-Ferrand) 198.
75. JAMIESON, A. y ANDERSON, K., 1973. A method for the isolation of *Naegleria* species from water samples Pathology 5: 55-58.
76. JANITSCHKE, K. 78. Examinations on the Occurrence of Pathogenic Strains of *Naegleria* and

Acanthamoeba in the Water of Indoor Swimming-Pools. Proc. IV. International Congress of Parasitol. Sect. A, p. 28. Varsovia, Agosto 1978.

77. JENSEN T. y DUBES, G.R., 1962. Clining titration and diferentiation of *Acanthamoeba* sp. by plating. J. Parasitol. 48: 280-286.

78. JENSEN, Th., BARNES, E., y HEYERS, D., 1970. Axenic cultivation of large populations of *Acanthamoeba castellanii* (JBM). J. Parasitol. 56: 904-906.

79. JOHN, J. y ANDUJAR, M.D. (1971). The pathogenic nonentamebic amebae (*Hartmannella* amebae). Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases. 139-144.

80. JONCKHEERE, Johan F. 1978. The importance of Nonpathogenic *Naegleria fowleri* Strains. Proc. IV International Congress of Parasitology. Varsovia, Agosto, 1978. Sect. A, p. 33.

81. KASPRZAK, W. y MAZUR, T., 1972. Free-living amoebae isolated from waters frecuented by people in the vicinity of Poznan, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. Z Tropen. Med. Parasit., 23: 391-398.

82. KASPRZAK, W. y MAZUR, T., 1973. Method of isolation of free-living amoebae from their natural habitat. Wiad. Parazyt. 19: 855-864.

83. KASPRZAK, W., MAZUR, T., y RUCKA, A., 1973. Pathogenic, strains of free-living amoeba isolated from lakes in the environs of Poznan, Poland. Progress, Protozool. (Clemont-Ferrand) 213.

84. KASPRZAK, W. y MAZUR, T., 1974. Small free-living amoebae isolated from warm lakes. Investigations on epidemiology and virulence of the strains. In Third International Congress of Parasitology. Facta Publication Proceedings vol. I: 188.

85. KASPRZAK W. MAZUR. T. y RUCKA, A., 1974. Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54: 351-357.

86. KASPRZAK, W. y MAZUR, T., 1976. The effect of thermic pollution of waters on the distribution of pathogenic *Naegleria* strains. Wiadom. Parazyt. XXII (4-5), 457-459.

87. KASPRZAK, W. y MAZUR, T. 1978. Enviromental Strains of *Naegleria fowleri*. Proc. IV International Congress of Parasitology. Varsovia, Agosto 1978. Sect. A, p. 29.

88. KATHERINE, M.G., ADAM, D.A., BLEWETT y EAMM. W.G.F., 1969. The DNA of *Acanthamoeba* sp. A method for extraction and its characterization. J. Protozool. 16: 6-12.

89. KINGSTON, D. y WAHRUST, D.C., 1969. Isolation of amoebae from the air. J. Med. Microb. 2: 27-36.

90. KUDO, R.R., 1946. Protozoology. 3rd ed. Springfield-London: Bailliere, Tindall y Cox.

91. LASMAN, M. (1975). Glucosidase activity in *Acanthamoeba (Mayorella) palestinensis*. The effect of glucose and natural glucosides on α and β - glucosidases. J. of Protozool. 22: 435-7.

92. LASMAN, M., 1977. Light and electron microscopic observations on encystment of *Acanthamoeba palestinensis*. Journal of Protozoology Vol. 24, Núm. 2, 244-248.

93. LESAGE, A., 1905. Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds. Ann. Inst. Pasteur 19: 9-16.

94. Mac. CONNEL, E.E. y KING, J.H., 1968. Hartmannellosis. Bull. Path. Vet. 5: 1-6.

95. MANDAL, B.N., GUDEZ, D.J., KITHETT, M.R., PULLON, D.H., MALDONH, J.A., DAVID, C.M. y APHORP. J., 1970. Acute meningo-encephalitis due to amoeba of the order *Myxomycetale*. (Smile mould). N.Z. Med. J. 71: 16-23.

96. MARKOWITZ, S.M., MARTINEZ, A.J., DUMA, R.J. y SCHIEL, F.O.M., 1974. Primary amoebic meningoencephalitis: Associated myocardial lesions. In Third International Congress of Parasitology. Proceedings. Vol. I: Facta publication pg. 178-179.

97. MARTINEZ, Julio. 1978. *Naegleria* and *Acanthamoeba* sp. Infecciones: Clinicopathological Features. Proc. IV International Congress of Parasitology. Varsovia, Agosto, 1978 Sect. A, p. 32.

98. MASCARO LAZCANO, M.C.; GUEVARA BENITEZ, D. de la RUBIA NIETO, A. y OSUNA CARRILLO, A. 1978. Aspectos metodológicos en el estudio de amebas limax. Rev. Iber. Parasitol. (en prensa).

99. MASCARO-LAZCANO, M.C.; GUEVARA-BENITEZ, D.C.; FLUVIA-BRU, M.C. y OSUNA CARRILLO, A. 1978. Características morfológicas y comportamiento en cultivo de: *Hartmannella vermiformis*, Page, 1967; *Hartmannella glebae*, Dobel emend Singh, 1952; *Acanthamoeba polyphaga*, (Puscharew, 1913) Page 1967; *Acanthamoeba castellanii* Douglas emend Page, 1967, (*Hartmannellidae*) y *Schizopyrenidae* sp. (*Schizopyrenidae*). Rev. Iber. Parasitol. (En prensa).

100. MASCARO, C.; FLUVIA, C.; GUEVARA, D.C. OSUNA, A.; y GUEVARA, D. 1978. Isolation and Identification of Limax Amoebae from Fresh Water. Proc. IV International Congress of Parasitology, Varsovia, Agosto, 1978 Sect. A, p. 26.

101. MAZURT, T. y KASPRZAK, W. 1978. The Growth of *Acanthamoeba* and *Naegleria* in Different Media. Proc. IV International Congress of Parasitology, Varsovia, Agosto, 1978. Sect. A, p. 58.

102. MENAPACE, D. y COLS., 1975. A simplified overlay plaque technic for evaluating responses of small free-living amoebae in grassland soils. J. Protozool. 22, 405-410.

103. MOLET, B., DERR-HARF, C., SCHREIBER, J-E. et KREMER, M., 1976. Etude des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. Annales de Parasitologie Humaine et comparée 51, Núm. 4, 401-406.

104. MUSGRAVE, W.E. y CLEGG, M.T., 1906. The cultivation and pathogenesis of amoebae. Phillip J. Sci. 1.

105. NAPOLITANO, J.J., WALL, H.E. y GANZ, C.S., 1970. *Adelphamoeba galeacystis* n.g. sp. an amoeba-flagellate isolated from soil. J. Protozool. 17: 158-161.

106. NEFF, R.J., 1957. Purification, axenic cultivation and description of a soil amoeba. *Acanthamoeba* sp. J. Protozool. 4: 176-182.
107. NEFF, J.R., 1958. Mechanism of purifying amoeba by migration on agar surfaces. J. Protozool. 5: 226-231.
108. NOC, F., 1909. Recherches sur la dysenterie amebienne en Conchinchine. Ann. Inst. Pasteur 23: 177-204.
109. OCKERT, G. y LEUE, G. 1978. Hartmannella –and Naegleria– Infections of Human Respiratory Tract. Proc. IV International Congress of Parasitology, Varsovia, Agosto, 1978. Sect. A, p. 37.
110. PAGE, F.C., 1966. Taxonomical criteria for small amoebae with a redefinition of the genera *Hartmannella* and *Acanthamoeba* and description of eight new species. Ph D. thesis University of Wisconsin.
111. PAGE, F.C., 1967. Redefinition of the genus *Acanthamoeba* with description of three species. J. Protozool. 14: 709-724.
112. PAGE, F.C., 1967. Cytologie d'une Amibe terricole: *Acanthamoeba terricola* n. sp. Ann. Soc. Nat. Zool. 6: 565-600.
113. PAGE, F.C. (1967). Taxonomic criteria for limax amoebae. J. of Protozool. 14: 22. (Abstracts).
114. PAGE, F.C., 1968. Generic criteria for *Flabellula*, *Rugipes* and *Hyalodiscus*, with descriptions of species. J. Protozool. 15: 9-26.
115. PAGE, F.C., 1969. *Hartmannella limax*, the original limax amoeba? Trans. Am. Mic. Roy. Soc. 88: 199-204.
116. PAGE, F.C., 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with description of new species and a key to genera. Arch. Protistenk. 116: 149-184.
117. PATRAS, D., y ANDUJAR, J.J. 1966. Meningoencephalitis Due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). Amer. J. Clin. Path., 46, 226-223.
118. PITTAM, M.D., 1963. Studies of an amoeba flagellate *Naegleria gruberi*. Q. Journ. Micro. Sci. 104: 513-529.
119. PROCA, M.I.; LUPASCU, G.H. y STERIU, D. (1973). Isolation of a pathogenic strain of *Acanthamoeba castellani* in Romania. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. 32 (20): 205-10.
120. PROCA-CIOBAN, Mara y GANCEVICI, G. 1978. Some Aspects of *Acanthamoeba* Cell Ageing. Proc. IV International Congress of Parasitology, Varsovia, Agosto, 1978 Sect. A., p. 30.

121. PUSSARD, M., 1963. Comportement de la vacuola pulsatile pendant la division nucleaire chez les amibes du genre *Acanthamoeba* (famille des *Hartmannellidae*). C.R. Acad. Sci. 256: 5397-9.
122. PUSSARD, M., 1963. La cariocinesis des amibes du genre *Acanthamoeba* (famille des *Hartmannellidae*). C.R. Acad. Sci. 256: 2695-7.
123. PUSSARD, M., 1966. Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931 (*Hartmannellidae*) Amoebida *Protistologica* 2: 71-94.
124. PUSSARD, M., 1972. Comparaison morphologique de 4 souches d'*Acanthamoeba* du groupe *astronyxis-comandoni*. J. Protozool. 19: 557-563.
125. PUSSARD, M., 1973. Modalites de la division nucleaire et taxonomie chez les amibes (*Amoeba*, *Protozoa*). Revision des notions de promitose, mesomitose, et metomitose. *Protistologica*, 9: 163-173.
126. PUSSARD, M., 1974. La morphologie des amibes libres. Interet et principes d'etude. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 54: 249-257.
127. RAY, L. y HAYES, R.E. (1954). *Hartmannella astronyxis*: a new species of free living amoeba. Cytology and life-cycle. J. Morphol. 95: 159-78.
128. SAWYER, T.K. y GRIFFIN, J.L., 1971. *Acanthamoeba comandoni* and *A. astronyxis*: Taxonomic characteristic of mitotic nuclei "centrosomes" and cysts. J. Protozool. 18: 382-387.
129. SAWYER, T.K.; VISVESVARA, G.S. y HARKE, B.A. (1977). Pathogenic amoebas from Brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science*. 196: 1324-5.
130. SAYGI, G., 1974. Studies on the isolation and the pathogenicity of *Acanthamoeba* sp. at 2000 metres above sea level. In Third International Congress of Parasitology Proceeding Vol. I: 189 *Facta* Publication.
131. SCHARDINGER, F., 1899. Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (*Gymnamoeba*): *Amoeba gruberi*. Sitzb. Keiserl. Akad. wiss. Abt. 108: 713-734.
132. SCHAUDINN, F., 1903. Untersuchungen Uber die Fortpflanzung der *Rhizopoden*. Arb. Kais. Gesundheitsamte 19: 547-576.
133. SCHMOLLER, H., 1964. Beschreibung einiger Kulturamoeben mariner Herkunft. J. *Protistologica* 11: 502-505.
134. SCHUTER, F.L. (1969). Internuclear virus like bodies in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. J. Protozool. 16 (4): 724-7.

135. SCHUTER, F.L. y DUNNEBACKE, T.H., 1974. Virus like particles and an unassociated infections agent in amoebae of the genus *Naegleria* Ann. de la Soc. Belge de Med. Trop. 54: 359-70.
136. SINGH, B.N., 1952. Nuclear division in nine species of small free-living amoeba and its bearing on the classification of the Order *Amoebida*. Phil. Trans. Roy. Soc. London 236: 405-61.
137. SINGH, B.N. y Das, S.R., 1970. Studies on pathogenic and non pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order *Amoebida*. Phil. Trans. Roy. Soc. London 259, 435-476.
138. SINGH, B.N. y DAS, S.R., 1972. Occurrence of pathogenic *Naegleria aerobia*, *H. culbertsoni* and *H. rhysodes* in sewage sludge samples of Lucknow. Curr. Sci. 41: 277-281.
139. SKOCIL, V.; CERVA, L. y SERBUS, C. (1970). Epidemiological study of amoebas of the limax group in military communities. First report. J. Hyg. Epid. Mer. Inn. 14: 61-66.
140. STEVENS, A.R.; GALLUP, E.; DE JONCKHEERE, J. y WILAERT, E. 1978. Differences in Ultrastructure and Lectin Sensitivity of Pathogenic and Nonpathogenic *Naegleria fowleri*. Proc. IV International Congress of Parasitology. Varsovia, Agosto, 1978. Séct. A, p. 31.
141. TODD, S.R. y KITCHING, A.J., 1975. Cultivation of *Acanthamoeba castellanii*. Neff strain at high hydrostatic pressures. J. Protozool. 22: 105-106.
142. VANDEPITTE, J. et COLS., 1974. A new case of, primary amoebic meningoencephalitis observed in Belgium. Ann. Soc. Belg. Méd. Trop. 54, (4-5) 279-303.
143. VISVESVARA, G., 1975. Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae with special reference to *Acanthamoeba*. J. Protozool. 22: 245-257.
144. VISVESVARA, G.S. y HEALY, G.R., 1974. Isolation of a strain of pathogenic *Naegleria fowleri* from a human nasal swab. J. Protozool. 21: (Abstracts): 438.
145. VISVESVARA, G.S. y cols. (1975). Isolation, identification and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 24 (5): 784-90.
146. VOLKONSKY, M., 1931. *Hartmannella castellanii*: Douglas et classification des Hartmannelles. Arch. Zool. Exp. gen. 72: 317-39.
147. WALKER, E., 1908. The parasitic amoebae of the intestinal tract of man and other animals. J. Med. Res. 17: 379-459.
148. WANG, S.A. y FELDMAN, H.A., 1961. Occurrence of *Acanthamoebae* in tissue cultures inoculated with human pharyngeal swabs. Antimicrob. Ag. Chemother. 1: 50-53.
149. WANG, S.S. y FELDMAN, H.A., 1967. Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *Ne. England J. Med.* 277: 1174-1179.

150. WELLS, R., 1911. Aerial contamination as a fallacy in the study of amebic infections. *Parasitology* 4: 206.
151. WENYON, C.M. 1926. *Protozoology*. London: Bailliere, Tindall y Cox.
152. WILSON, D.E.; BOVEE, E.C. y TELFORD, S.R. Jr. (1967). Induction of amebiasis in tissues of white mice and rats by subcutaneous inoculation of small free-living, inquilinic and parasitic amoebas associated with coliformbacteria. *Exp. Parasit.* 21: 277-286.
153. WILLAERT, E. (1974). Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.* 54 (4-5): 429-40.
154. WILLAERT, E. 1976. Etude Immuno-taxonomique des Genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebida). *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia*, Núm. 65, (Dic. 1967) pp. 6-239.
155. WILLMER, E.N., 1961. Amoeba flagellate transformation. *Exp. Cell. Rés Suppl.* 8: 17-31.
156. WONG, H.M.; KARR, S.L. y BALAMUTH, W.B. (1975). Experimental infections with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate host: I (B). A study on susceptibility to *Acanthamoeba culbertsoni*. *J. of Parasitol.* 61: 682-690.

