

## **Demostración del ameboflagelado *Naegleria fowleri* como agente etiológico de meningoencefalitis amébrica primaria en Santiago de Cuba**

### **Demonstration of flagellum ameba *Naegleria fowleri* as etiological agent of primary amebic meningoencephalitis in Santiago de Cuba**

**Dra. Lillian Sierra Calzado**

Instituto Superior de Ciencias Médicas, Facultad No. 2, Departamento de Ciencias Morfológicas, Santiago de Cuba.

---

#### **RESUMEN**

En los últimos años se ha demostrado que el amebo-flagelado *Naegleria fowleri* es el causante de la meningoencefalitis amébrica primaria (MEAP). En Cuba ha sido mencionada la sospecha de su presencia en un líquido céfalo-raquídeo (LCR) de una ameba cuya locomoción y circunstancias sugería que pudiera ser esta ameba. Se realizó el análisis en fresco y en cultivo, con Test de Flagelación de 64 muestras de LCR seleccionadas al azar a partir de las 173 que presentaron las características de transparencia y negatividad a bacterias, requisitos iniciales en búsqueda de este agente, partiendo de una muestra inicial de 1 488 muestras de LCR procedentes de pacientes con meningoencefalitis clínicamente establecidas. De estos 64 LCR, 2 resultaron positivos a la evaluación por los diferentes métodos lo que permitió teñirlos con Giemsa, demostrar su capacidad de flagelación y su resistencia a TMT. Las características citoquímicas de los líquidos concordaban con lo planteado en la literatura y uno de los pacientes sobrevivió, el otro falleció. La patogenicidad de los ameboflagelados aislados de esas dos muestras de LCR se comprobó en el modelo animal ratón albino suizo y fueron observados al microscopio electrónico. Lo anterior confirma microbiológicamente por primera vez en el país este agente etiológico, aunque ya había elementos clínicos y de laboratorio de sospecha en casos anteriores.

**Palabras clave:** Meningoencefalitis amébrica primaria, *Naegleria fowleri*, líquido céfalo raquídeo.

---

## ABSTRACT

During the last years it has been demonstrated that the flagellae-carrying ameba *Naegleria fowleri* is the aethiologic agent of the primary amoebic meningoencephalitis (PAME), in Cuba the suspicion of its presence has been mentioned in a Cefalo Raquideal Fluid (CRF) of an ameba whose locomotion and circumstances suggested that it could be this organism. The present work carries out the analysis in fresh CRF samples and after culture, performing the Flagelation Test of the 64 CRF that presented the characteristics of transparency and negativity to bacterial culture, needed to suspicion of this flagellae-carrying ameba, leaving of an starting sample of 1488 CRF. From this analysed sample of CRF only two were positive to the observation of amebas what allowed to tint them with Giemsa and also with Lugol, to demonstrate their flagelation capacity and their resistance to TMT in the corresponding test. The citochemical characteristics of the liquids agreed with that outlined in the literature for this organisms, and one of the patients survived, the other one died. The patogenicity of the isolated flagellae-carrying amebas was proven in the animal model of Swiss albino mouse and both isolated strains were observed by the electronic microscope. This results are the basis for considering the present report the first one confirming *N.Fowleri* as aetiologic agent in two cases of PAME in Cuba.

**Key words:** Primary amoebic meningo-encephalitis (PAME), *Naegleria fowleri*, cefalo raquídeo fluid.

---

## INTRODUCCIÓN

Desde hace 50 años es conocido que existen amebas de vida libre capaces de causar enfermedades a humanos. Fue necesario que el conocimiento científico sobre ellas pasara por diferentes periodos para que se definiera según *Shuster*,<sup>1</sup> que la primera en descubrirse fueron las amebas patógenas del género *Naegleria*.

En los últimos años, en diferentes regiones del mundo se ha demostrado que el ameboflagelado de vida libre *Naegleria fowleri*, es el causante de la meningoencefalitis amébrica primaria (MEAP), considerada como una urgencia médica, y por tanto de mucho interés para el médico general y para el especialista.

Hasta la fecha, se ha reportado por *Oddó*,<sup>2</sup> cerca de 200 casos bien documentados, de ellos 176 entre Virginia, Florida y California de los cuales solo sobrevivieron 6, sin embargo, según *Tolan*<sup>3</sup> se han reportado 300 casos de MEAP en Estados Unidos, Australia y Europa, con 5 supervivientes que corresponden al 1,7 %, y *Vargas-Cepeda*<sup>4</sup> reporta que solo 8 han sido curados. Esta cifra de casos parece muy subestimada ya que la realización de autopsias no se efectúa siempre y porque el médico general y el personal de laboratorio no están entrenados para diferenciar una meningoencefalitis viral o bacteriana de una infección amébrica.

El diagnóstico en el hombre se basa fundamentalmente en el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), el cual aunque puede realizarse en fresco de forma directa, *Siripanth's*<sup>5</sup> define muy claramente lo que otros autores también mencionan, que el aislamiento de los trofozoitos del LCR debe ser considerado un diagnóstico positivo pero debe realizarse para su confirmación, el cultivo y la tinción. Esta confirmación puede ser con la coloración de *Wright* o *Giemsa*.<sup>6-10</sup> En Cuba, *Sotolongo*<sup>11</sup> hizo una revisión sobre meningoencefalitis provocadas por amebas de vida libre, y reporta su observación al microscopio óptico (MO) de una ameba en un líquido cefalorraquídeo, la cual realizaba un movimiento rectilíneo y tenía forma de lágrima, por lo que la considera como *Naegleria*; también en Cuba, *García-Tijera*<sup>12</sup> considera un caso sospechoso de MEAP, y se basa en que el enfermo se recupera con anfotericina B, pero los síntomas aparecen a los 5 días y plantea dolores musculares, e hiperestesia en miembros inferiores y abdomen que no coinciden con ninguna de las literaturas revisadas, plantea 22 días de curso de la enfermedad que según la mayoría de los otros autores solo posee de 5 a 7 y no menciona haber realizado aislamiento ninguno a partir del LCR.

## MÉTODOS

Durante un período de 3 meses se colectaron 1 488 LCR, extraídos en los hospitales de Santiago de Cuba, "Saturnino Lora" y ONDI Santiago Norte, a partir de pacientes con diagnóstico clínico de meningoencefalitis, de los cuales 173 resultaron turbios y negativos a las pruebas de bacterias, bien sea al cultivo o a la Prueba de Gram, requisito indispensable para sospechar la presencia en ellos de *Naegleria*, 45 muestras de LCR resultaron traumáticas.

Un total de 64 muestras de LCR tomadas al azar a partir de las 173 que reunían los criterios de sospecha necesarios fueron procesadas en el Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Biología de la Universidad de Oriente por la autora como uno de los bloques experimentales de su trabajo de Tesis Doctoral. De cada uno de los líquidos fueron obtenidos los siguientes datos: aspecto del líquido, análisis citoquímico, conteo diferencial de células sanguíneas, datos generales del paciente y diagnóstico presuntivo y otros datos de la HC.

En los casos necesarios al comprobarse la positividad de las muestras fueron realizadas entrevistas a los familiares del paciente, y visitas al lugar de residencia, se enfatizó en las premisas de la enfermedad, antecedentes de inmersión en agua, así como la revisión de la historia clínica, se realizó en caso de existir inmersión en agua, la toma de muestra del depósito que la contenía. Las muestras fueron analizadas por dos métodos, un examen directo al microscopio de contraste de fase (MGG-LAY) en gota colgante, según *Carter KF*<sup>13</sup> y un método de cultivo en Agar NN al 3 % con *E. coli* en extendido como *Cerva L.*<sup>8</sup> Los LCR fueron también observados con la tinción de Giemsa conforme a *Dos Santos JG*,<sup>6</sup> *Culbertson CG*,<sup>7</sup> *Cerva L.*,<sup>8</sup> *John DT*,<sup>9</sup> *De Jonckheere JF* y *Martinez AJ*.<sup>10</sup>

Al cuarto día de efectuada la siembra, las placas fueron observadas al microscopio invertido (160 x) y con posterioridad se realizó el Test de Flagelación a temperatura ambiente (29-31 °C), adicionando 3 mL de agua destilada estéril a la superficie de las placas de Agar, y pasando una espátula de Drigalsky.

La suspensión se trasladó a tubos de ensayo con tapas de rosca de 25 mL previamente esterilizado. La observación se realizó cada 1 h durante 1 día según *Cerva*.<sup>8</sup> Las placas de Agar NN fueron subcultivadas en 3 ocasiones, y se realizó el test de flagelación en cada caso con agua destilada. Después de este paso, se

efectuó el proceso de axenización en medio Bacto Casitone Suero (BCS) con penicilina, polimixina B y streptomocina, incubando a 37 °C como *Cerva*.<sup>8</sup>

Todas las suspensiones para las observación de *Naegleria*, fueron llevadas a cabo en gota colgante al microscopio MBB en contraste de fase con aumento de 1600 x , y comparadas con las descripciones realizadas por *Siripanth*,<sup>5</sup> *Culbertson*,<sup>7</sup> *John*,<sup>9</sup> *De Jonckheere* y *Martínez*,<sup>10</sup> *Carter*,<sup>13</sup> y posteriormente con las descripciones de *Bonilla*.<sup>14</sup>

Solo se aplicó Lugol para observar el flagelo en el estadio correspondiente y Giemsa y hematoxilina Gomori Tricromo para la tinción de los trofozoitos, de modo que fueron comparadas con las cepas HB-1 de *N. fowleri* y M3-1 de *N. lovaniensis* del Laboratorio de Protozoología de Medicina Tropical de Praga, que fueron teñidas con Gomori- tricromo y con Hematoxilina férrica más Gomory-Tricromo respectivamente por cortesía del Dr. C.L. *Cerva*.

### **Evaluación de la patogenicidad de los ameboflagelados aislados**

El análisis de las cepas de los LCR positivos se efectuó a partir de aislamientos realizados los que se mantuvieron en incubación continua hasta su evaluación.

La experiencia se realizó con ratones machos suizos albinos de 15 días de nacidos, de un peso promedio de 8 g, cuyo pie de cría procedía del CENPALAB y se mantenían para su procreación en condiciones de adecuada aireación, régimen de luz y oscuridad natural, con limpieza diaria de sus cajas de cría y suministro de pienso y agua fresca, hasta ser llevados al laboratorio de experimentación después de alcanzar el tiempo y el peso adecuado.

Todo el proceso de experimentación con los animales se efectuó previa aceptación del protocolo de investigación por los consejos científicos de los centros implicados, teniendo en cuenta los criterios éticos e higiénicos y las condiciones del laboratorio y posterior cremación, así como todo el diseño de la investigación y justificación científica y bioética del número y tipo de animales.

Las inoculaciones se realizaron de forma intranasal y en el estadio flagelar con cada una de los aislamientos valorados, a 3 ratones tratados con el estrógeno no esterooidal dietilestilbestrol (DES), como depresor del sistema inmunológico según *Really* y otros<sup>15</sup> y otros 3 sin tratamiento con este producto. Para ambos casos se utilizaron 6 ratones control, 3 sin tratamiento y 3 tratados con DES e inoculados todos con una gota de agua destilada estéril, por lo que se usaron un total de 12 ratones en esta experiencia.

El inóculo se efectuó con una gota conteniendo aproximadamente  $8 \times 10^4$  células contadas en cámara de Newbauer, teniendo en cuenta las experiencias de *John*<sup>9</sup> y *Marciano-Cabral* y *John*,<sup>16</sup> a partir de 2 mL de agua destilada estéril puestos a reposar en una cultivo de amebas en placas de Agar NN con *E. coli* durante 3 h a temperatura ambiente.

Los ratones fueron anestesiados con éter etílico antes de la inoculación. Se mantuvieron de 3 a 5 días en el lugar donde permanecerían luego de ser inoculados a una temperatura ambiente. Se les cambió la viruta que les servía de cama semanalmente, excepto los que eran inyectados con DES a los cuales se les cambió diariamente, por lo que las condiciones higiénicas eran adecuadas, así como su alimentación que consistió en pienso y abundante agua.

Los ratones tratados con DES fueron inyectados durante 14 días con 1 mg/kg de peso e inoculados al segundo día de tratamiento de acuerdo con *Really* y otros.<sup>15</sup> Este procedimiento se efectuó durante 7 días por vía intravenosa y 7 días por vía intramuscular.

### **Prueba de Trimetoprin (TMT)**

Las cepas de los LCR aisladas fueron cultivadas en ANN y *E. coli* a 45°C fueron pasadas al medio axénico BCS (5 mL) al cual le fue adicionado Trimetoprin (6 gotas), de modo que el cultivo presentara una concentración de 40 µg/mL de TMT, según comunicación personal de *Cerva*. A su vez, se realizó una siembra control en BCS para cada una de las localidades.

Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 3 días, al cabo de los cuales se observaron en microscopio MBB con aumento 120 X.

### **Estudios al microscopio electrónico de barrido (SEM) de las cepas de ameboflagelados aisladas**

Las amebas se encontraban localizadas en la superficie de las placas de ANN con *E. coli* y fueron fijadas *in situ* con glutaraldehído al 2,5 % en 0,5 M de buffer fosfato.

Después de enjuagadas en la superficie del agar con buffer fosfato se realizó la posfijación en tetraóxido de osmio al 1 %, el centrifugado y la deshidratación de las amebas, luego fueron embebidas en araldite para seccionar, hallar el punto crítico de humedad, y sombreado en oro, conforme a *De Jonckheere* y otros<sup>17</sup> con un voltaje de aceleración de 20 kV utilizando el microscopio electrónico JEM 100T XII con aditamento para barrido ASID4D de fabricación japonesa del Departamento de Microscopía Electrónica del CENIC.

## **RESULTADOS**

De las 173 muestras turbias y negativas a bacterias se procedió a un muestreo aleatorio del cual resultaron 64 LCR que fueron procesados, solo dos resultaron positivas a la siembra en Agar NN y al test de flagelación (tabla 1), coincidiendo en ambos casos que fueron negativas a bacterias y con los parámetros citoquímicos típicos para los casos de MEAP (tabla 2).

El estudio de las cepas aisladas de los 2 casos permitió confirmar la ameba como agente infeccioso, las que resultaron resistentes al test TMT y positivas al Test de Flagelación como corresponde, así como patogénicas en el modelo animal de ratón (tabla 3).

**Tabla 1.** Anorgasmia y grupo de edades

Grupos de edades	Tipo de anorgasmia						Total
	Mujeres normales		Anorgásmicas fortuitas		Anorgásmicas coitales		
	No.	%	No.	%	No.	%	
≤ 19	5	25	8	40	7	35	20
20-29	65	61,3	19	17,9	22	20,7	106
30-39	34	56,6	8	13,3	18	30	60
40-49	11	45,8	5	20,8	8	33,3	24
≥ 50	13	76,4	2	11,7	2	11,7	17
Total	128	56,4	42	18,5	57	25,1	227

Fuente: Encuesta.

**Tabla 2.** Anorgasmia y nivel de escolaridad

Nivel escolar	Tipo de anorgasmia						Total
	Mujeres normales		Anorgásmicas fortuitas		Anorgásmicas coitales		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Bajo	7	36,8	1	5,2	11	35	19
Medio	60	51,7	22	18,9	34	20,7	116
Superior	61	66,3	19	20,6	12	30	92
Total	128	56,6	42	18,5	57	25,1	227

Fuente: Encuesta.

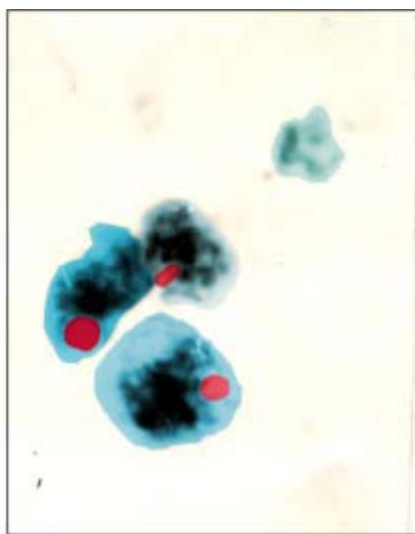
**Tabla 3.** Anorgasmia y edad de la primera relación sexual

Edad de la 1ra relación sexual	Tipo de anorgasmia						Total
	Mujeres normales		Anorgásmicas fortuitas		Anorgásmicas coitales		
	No.	%	No.	%	No.	%	
≤13	6	54,4	1	9,09	4	36,3	11
14-17	72	48	30	20	48	32	150
≥18	50	75,7	11	16,6	5	7,5	66
Total	128	56,4	42	18,5	57	25,1	227

Fuente: Encuesta.

### Resultados de microscopía electrónica

Los trofozoitos aislados, teñidos con Giemsa permitieron la observación de un citoplasma azul claro con núcleo rojo púrpura (figura 1).



**Fig. 1.** Microfotografía de trofozoitos de *Naegleria fowleri* aislado en líquido cefalorraquídeo positivo (1 250x).

Las características morfológicas y tintoriales observadas para las cepas aisladas de ambos casos son exactamente iguales e indistinguibles, tanto al microscopio de contraste de fase como electrónico, la única diferencia encontrada radica en su patogenicidad en ratón y en los casos clínicos en sí (figura 2).



**Fig. 2.** Microfotografía de trofozoito al microscopio electrónico de barrido del ameboflagelado aislado caso 1 con pre-amebostomas (6 000 x).

Estas observaciones fueron confirmadas en Checoslovaquia directamente por el Profesor *Cerva* en su laboratorio.

## Patogenicidad

El ensayo de patogenicidad en ratones arrojó los siguientes resultados: la cepa aislada del caso 1 el cual es el niño de 4 años que sobrevivió a la meningoencefalitis, resultó patogénica para el 33 % de los ratones inoculados, mientras que la cepa aislada del caso 2 del hombre de 59 años que falleció, fue letal en el 100 % de los ratones inoculados. Ambas cepas resultaron resistentes al TMT y positivas al test de flagelación (tabla 4).

**Tabla 4.** Relación del orgasmo y masturbación femenina

Tipo de anorgasmia	Orgasmo a través de la masturbación				
	Sí		No		Total
	No.	%	No.	%	
Mujeres normales	82	64,06	46	39,9	128
Anorgásmicas fortuitas	23	54,7	19	45,2	42
Anorgásmicas coitales	38	66,6	19	33,3	57
Total	143	62,9	84	37	227

Fuente: Encuesta.

En ambos casos mediante encuesta epidemiológica y muestreo se detectaron las posibles fuentes de infestación. En el caso 1, una pequeña piscina del círculo infantil del niño y en el caso 2 un tanque de agua mantenido en zona calurosa tapado con un saco y usado como abasto de agua para la casa. De ambos contenedores de agua se aisló un ameboflagelado resistente al TMT, positivo al test de flagelación y letal en más de 505 de los ratones inoculados, con iguales características morfológicas y tintoriales que los aislamientos del LCR. Todo lo cual es consistente con causa probable.

## DISCUSIÓN

Según *De Jonckheere*<sup>10</sup> las características generales del LCR en la MEAP son el tener un aspecto turbio o grisáceo, aunque puede que alguno luzca traumático, con una celularidad variable a predominio de neutrófilos, aunque pueden contarse también linfocitos y escasos monocitos, y oscilan en total entre 26 y 300 000 células por mm<sup>3</sup>, las proteínas suelen ser elevadas y oscilan entre 75 y 970 mg %, y la glucosa suele estar disminuida, son negativos a bacterias. Estas dos muestras de LCR encontradas positivas al ameboflagelado reúnen esas características generales coincidiendo por tanto con la literatura más autorizada sobre el tema.

Los cultivos fueron realizados a partir de los dos LCR positivos, para garantizar el aislamiento y la identificación, esta se realizó coincidiendo con el criterio de *Kilvington* y otros,<sup>18</sup> quienes habían señalado que en las muestras clínicas, el diagnóstico se define con el aislamiento de trofozoitos en Agar NN con bacterias, así



mismo *Siripanth*s y otros,<sup>5</sup> refieren que el aislamiento de los trofozoitos del LCR es un diagnóstico positivo, pero siempre debe ser llevado hasta su cultivo y métodos de tinción con Wright o Giemsa para la confirmación. Este trabajo cumple con ambos preceptos de la literatura.

Como puede observarse en los resultados, de los 45 LCR que se presentaron traumáticos, ninguno resultó positivo, aunque *Khan*,<sup>19</sup> plantea que los positivos a MEAP pueden presentarse hemorrágicos y describe un caso con estas características. Los aislamientos en este estudio no procedieron de líquidos traumáticos, estos se desecharon al inicio.

### **Análisis de las muestras que resultaron positivas**

El análisis citoquímico del LCR de uno de estos pacientes, mostró las siguientes características: células 1 370/mm<sup>3</sup>, glucosa 42 mg %, proteínas 140 mg % y negativo a bacterias. La historia clínica del paciente correspondiente reflejó la aplicación de quemicetina y dilantín con su curación días después del tratamiento.

Efectuada la entrevista a la familia, resultó ser un niño de 4 años de edad, que se bañaba en la pequeña piscina del círculo infantil, cuya agua se llenaba a partir de una cisterna y que presentó todos los síntomas característicos de meningoencefalitis, mientras que en 3 análisis evolutivos del LCR, fue negativo a bacterias y en 2 ocasiones positivos al cultivo y test de flagelación de la ameba.

Los análisis de las aguas de depósito del hogar y de la cisterna del círculo infantil realizadas con la misma metodología descrita fueron positivos al cultivo de *Naegleria*.

El otro caso positivo lo constituyó un líquido turbio de un hombre de 59 años el cual falleció. La necropsia determinó como causa de la muerte, una hemorragia intraparenquimatosa en el lóbulo parietal del hemisferio cerebral derecho con inundación ventricular y hemorragia subaracnoidea difusa, cuestión que concuerda con lo expresado por *Culbertson*<sup>7</sup> que plantea, que cuando las amebas invaden el cerebro, dañan los capilares y producen las más severas hemorragias, llegan a penetrar por los grandes vasos y producir trombosis. Este caso adulto fue hospitalizado por 1 sem y falleció a pesar de los cuidados intensivos. No presentaba antecedentes de inmersión, situación que es también informada por *Griffin*<sup>20</sup> y otros autores, tales como *Hoffman*,<sup>21</sup> que reporta 29 casos en los últimos años, algunos sin existir inmersión en agua, y la ameba en su caso fue aislada en las aguas de tanques de agua y el filtro del refrigerador de su casa.

En este caso mediante visita directa y encuesta epidemiológica detectamos que el agua de la cual se abastecía la familia, se encontraba en un depósito metálico tapado con un saco y colocado directamente bajo el calor del sol, por lo que las condiciones de temperatura y materia orgánica eran adecuadas para el desarrollo del organismo.

Al revisar la historia clínica del fallecido, constatamos que fue realizada una punción lumbar con presencia de 96 células/mm<sup>3</sup>, proteínas 513 mg % y había tenido fiebres de 39 °C en días posteriores al ingreso.

Realizada la entrevista a los familiares, resultó que el fallecido se quejaba de fuertes dolores de cabeza, fatiga y vómitos, síntomas semejantes a los planteados por otros trabajos consultados. No obstante la edad del paciente no coincide con la de hombres jóvenes, como reporta en general la literatura con más frecuencia y el

número de células del LCR más bajo que el habitual, presentó evidente positividad en el cultivo, que además era turbio, no hemorrágico, ni transparente.

Es evidente que de los LCR estudiados se reportan dos casos de MEAP: uno sobreviviente y uno fallecido. Las cepas causantes de la enfermedad aisladas del LCR, son morfológicamente indistinguibles, tanto al microscopio de contraste de fase como al electrónico, también sus caracteres tintoriales y de resistencia al TMT son idénticas, solo difieren en cuanto a su patogenicidad en el modelo ratón, la del caso 1 fue del 33 % de los ratones inoculados y la del caso 2, del 100 % de los ratones inoculados, el caso 1 se salvó y el caso 2 falleció, aunque en el caso 1 concurre también la circunstancia del uso del dilantín, un anticonvulsivante que resulta contener un grupo químico análogo estructural del miconazol, el anillo imidazólico, reportado como antiamebico.

Aspecto a destacar del caso del sobreviviente es el hecho de que el enfermo no fue tratado ni con anfotericina B, ni con miconazole u otro equivalente, que son los fármacos que se reportan más efectivos o de elección en el tratamiento de esta fatal enfermedad, hecho que tiene sus razones probables, en la valoración del papel de las características de la estructura química del dilantín.

*Bonilla*<sup>14</sup> menciona como droga de elección la anfotericina B al igual que otros autores, sin embargo, *Darby* y otros<sup>22</sup> informan un sobreviviente de MEAP en California tratado con miconazol y aclara que no pudo definirse con claridad el efecto por separado, pues también se trató con anfotericina B.

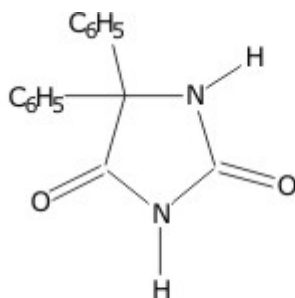
*John*<sup>9</sup> trata de forma aislada el miconazol sin anfotericina B y también obtiene cura del enfermo, por lo que sí puede definirse su efecto beneficioso.

Con estos elementos, se analizaron las características del cloranfenicol o quemisetina y se encontró un conocido antibiótico bactericida contra bacterias Gram y +, Micoplasmas, abscesos cerebrales y meningitis. Diferentes autores, plantean que la quemisetina inhibe la síntesis proteica bloqueando la subunidad ribosomal 50S, de modo que el cloranfenicol o quemisetina realiza la función similar a los otros fármacos reportados junto a la anfotericina B, en la Base de Datos de Medicamentos de Consulta del Consejo General de Colegios oficiales Farmacéuticos de España.<sup>23</sup>

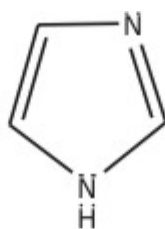
La anfotericina B, es un polieno antifúngico con afinidad por esteroides y ergosteroides de membranas de células de hongos, que forma canales en la membrana celular, causando la salida de los componentes intracelulares y con ello la muerte de la célula. Este fármaco se combina con los fármacos anteriormente mencionados, que lo sinergizan, entre ellos uno de los más usados, el rifampín.

La quemisetina o cloranfenicol actúa de forma similar al rifampín, entonces, ¿cuál sería el papel del dilantín? El dilantín o fenitoina o difenil hidantoina es un anticonvulsivante que se caracteriza por ser antiepiléptico y antiarrítmico, indicado para las taquicardias paroxísticas sin afectación de los potenciales de acción.<sup>23</sup>

Al revisar en la literatura el planteamiento de *Schuster y Mendel*<sup>24</sup> según el cual, los tranquilizantes mayores ejercen una acción inhibitoria del crecimiento de las amebas en el cerebro, y así lo manifiesta *Tolan*<sup>3</sup> sobre la fenotiazina. Buscamos en el dilantín las características que como anticonvulsivante pudiera tener una actividad similar a la que poseía la fenotiazina como tranquilizante mayor. Comparando sus fórmulas químicas, observamos que no existía ninguna similitud, pero sí observamos de inmediato el extraordinario parecido que posee la estructura química del dilantín (figura 3) con los Imidazoles (figura 4):



**Fig. 3.** Fórmula del dilantín.



**Fig. 4.** Fórmula del imidazol.

Ejemplo de ellos, el miconazol, metronidazol, antifúngicos y antiamélicos respectivamente, entonces se puede inferir que probablemente, por analogía química el papel del dilantín ha actuado como elemento primordial en la actividad antiamélica en el caso del niño que sobrevivió a la enfermedad. Con mayor razón si tenemos en cuenta el planteamiento referido en la Base de Datos del Medicamento ya referida,<sup>23</sup> que considera al cloranfenicol como potenciador de la actividad tóxica del dilantín aunque por sí solo no podía explicar la actividad antiamélica.

Es interesante hacer notar como *Abadd*<sup>25</sup> informa que los imidazoles inhiben la síntesis del ergosterol, constituyente importante de la membrana plasmática de los hongos y por su parte la anfotericina B se une al ergosterol de la membrana plasmática de los hongos, formando canales que afectan la permeabilidad de la membrana (cuestión ya mencionada por otras literaturas), además de que se ha notado que ambos no deben combinarse, se desconoce el por qué.

Este autor nos da aún más elementos para considerar el papel del dilantín, pues la esencia es que inhibe la síntesis del ergosterol, impide la síntesis de membrana plasmática; la anfotericina por su parte se une al ergosterol para formar canales por donde salen los organelos de los hongos; es decir, rompe la membrana plasmática. Por tanto, en esencia, la consecuencia de ambos es la no estabilidad de la membrana y su necesaria semipermeabilidad, por afectación al ergosterol de la membrana plasmática por diferentes mecanismos.

Vale aclarar que es muy frecuente que los antibióticos que afectan hongos también lo hacen con amebas, célula eucariota, con diferente y superior morfología, composición y fisiología que las bacterias, de acuerdo a como corresponde a los distintos niveles de organización de la materia.

De esta manera, el mecanismo de acción propuesto pudo haber permitido la curación.

Esto nos pudiera llevar a pensar en una posible variante de tratamiento no considerada con anterioridad en ningún reporte de la literatura y que por supuesto requiere comprobación, pero que explicaría la supervivencia de un niño ante una infección que es en el 96 % de los casos letal según la revisión de la literatura mundial.<sup>3,4</sup>

En Cuba, *Sotolongo*<sup>11</sup> hizo una revisión sobre meningoencefalitis provocadas por amebas de vida libre, y reportó su observación al microscopio óptico (MO) de una ameba en un líquido cefalorraquídeo, la cual realizaba un movimiento rectilíneo y tenía forma de lágrima, por lo que la considera como *Naegleria*; también en Cuba, *García-Tijera*<sup>12</sup> considera un caso sospechoso de PAME, y su sospecha se basa en que el enfermo se recupera con anfotericina B, pero los síntomas aparecen a los 5 días y plantea dolores musculares e hiperestesia en miembros inferiores y abdomen que no coinciden con ninguna de las literaturas revisadas, plantea 22 días de curso de la enfermedad que según la mayoría de los otros autores solo posee de 5 a 7 y no menciona haber realizado aislamiento ninguno a partir del LCR. En el presente estudio se ha reunido la comprobación de los diferentes principios para afirmar que efectivamente *N. Fowleri* es el agente etiológico de esos dos casos de PAME, cerrando el ciclo de comprobación se llevó la cepa a un laboratorio y experto internacional, el Profesor *Cerva*.

Los hallazgos de tipo microbiológico, las características tintoriales, morfológicas, la resistencia al TMT, los resultados del test de flagelación, la patogenicidad en el modelo ratón, la observación al microscopio electrónico, la clínica de los casos y la comprobación epidemiológica de una muy probable fuente de contaminación, permiten afirmar que se trata de dos casos de meningoencefalitis amébrica primaria, por lo cual se recomiendan estudios más abarcadores desde el punto de vista epidemiológico, así como corroborar la actividad como antiaméptico del dilantín.

## AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Prof. Dr. V. *Gustavo Sierra González*, del Instituto Finlay y Presidente del Comité de Expertos en Vacunas de Cuba y Académico Titular de la ACC, por su valiosa asesoría en el análisis de los resultados de la investigación y la conformación de los manuscritos resultantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliate protozoa as causal agent of water borne zoonotic disease. *Vet. Parasitol.* 2004;126(1):91-120.
2. Oddó BD. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros clínicos. *Rev. Chi. Infect.* 2006;23(3):200-214.
3. Tolan RW. Amebic meningoencephalitis. Medscape reference. [updated Jan 28 2011]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/996227-overview>
4. Vargas-Cepeda J, Gómez-Alcalá AV, Vázquez-Morales JA, Licea-Amaya L, De Jonckheere JF, Lares-Villa F. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous anfotericine B, fluconazole and Rifampicin. *Arch. Med Res.* Jan-Feb.2005;6(1):83-6.

5. Siripanth Ch. Anphisoic amoebae: Pathogenic Free-living protozoo. Review of Cases in Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 2005;88(5):701-7.
6. Dos Santos JG. Fatal Primary Amoebic Meningoencefalitis; a retrospective study in Richmond, Virginia. Am.J.Clin.Pathol. 1970;54:737-42.
7. Culbertson CG. The pathogenicity of soil amoebas. Annu Rev Microbiol. 1971;25:231-54.
8. Cerva L. Laboratory diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis and method for the detection of *Limax amoeba* in the environment». Folia Parasitol: Prague. 1980;27:1-9.
9. John DT. Primary Amoebic Meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. Ann.Rev.Microbiol. 1982;36:101-23.
10. De Jonckheere JF, Martinez AJ. Les infections par les Amibes libres. Bull.LInst.Pateur 1981;79:171-205.
11. Sotolongo F. Meningoencefalitis por amebas de vida libre. Revista 16 de Abril. 1986;(119):8-9.
12. García Tijera J, Sotolongo F, Cepero F, Ibarra E, García J. Meningoencefalitis amebiana primaria. Estudio de un caso sospechoso y revisión de la literatura médica. Rev Cubana Med Trop. 1978;30:161-6.
13. Carter KF. Description of a *Naegleria sp* isolated from two cases of Primary Amoebic Meningoencephalitis, and of the experimental pathological induced by it. J Path. 1970;100(4):219-42.
14. Bonilla P. Ecología de las amebas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. [consulta 3 Sep 2011]. Disponible en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap3.html>
15. Really MF, White KL, Bradley SG. Host resistance of mice to *N.fowleri* infection. Infect Immun. 1983;42(2):645-52.
16. Marciano-Cabral F, John DT. Cytopatogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell culture: Scanning Electron Microscopic study. Infect.Immun. 1983;40(3):1214-7.
17. De Jonckheere JF, Pernin P, Scaglia M, Michel K. A comparative study of 14 strains of *Naegleria* a highly virulence subspecies: *N. australiensis italica*. J Protozool. 1984;31(2):324-31.
18. Kilvington S, Beeching J. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. Appl Environ Microbiol. 1995;61(10):3764-7.
19. Khan A. *Naegleria*. In: Microbial Pathogenesis. School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London. London UK; 2003. p. 227-285.
20. Griffin J. Parasitic Protozoo. Vol.II. New York: Academia Press;1977.

21. Hoffman R, Michel R. Distribution of free living amoeba during preparation supply of drinking water. *Inst. J. Hyg. Environ. Health*, maar vol. 2001;203:215-9.
22. Darby Ch, Conrado S, Holbrook Th, Chatellier Ch. Primary Amoebic Meningoencephalitis. *Am J Dis Child*. 1979;133:1025-7.
23. Bot: Base de Datos del Medicamento. Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos de España. 7<sup>ma</sup> Entrega; 2000. Disponible en: <http://www.cof.es/bot>
24. Schuster FL, Mendel N. Phenothiazine compounds inhibits in vitro growth of pathogenic free living amoeba. *Antimicro agent chemother*. 1984;25(1):109-12.
25. Abad F. Antagonismo entre Itraconazol y Anfotericina B. Prescripción de fármacos. *Hosp. Univ. De la Princesa. Univ. Autónoma de Madrid*. 1998;4(4).

Recibido: 18 de abril de 2011.

Aprobado: 3 de mayo de 2011.

Dra. *Lillian Sierra Calzado*. Instituto Superior de Ciencias Médicas. Departamento de Ciencias Morfológicas, Santiago de Cuba.

Autor para la correspondencia: Dr. *Gustavo Sierra*. Correo electrónico: [gustavosierra6352@yahoo.com](mailto:gustavosierra6352@yahoo.com)