

6. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30: 564-595.
7. Flisser A, Perez TR. Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas. Editores Textos Mexicanos, Mexico. 2006.
8. Matin A, Siddiqui R, Jayasekera S, Khan NA. Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21: 435-448.
9. Cabello-Vilchez AM, Reyes-Battle M, Montalbán-Sandoval E, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Elias-Letts R, Guerra H, Gotuzzo E, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Maciver SK, Valladares B, Lorenzo-Morales J. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. Parasitol Res. 2014; 13(7): 2509-2513.
10. Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Bokowski J, Chaljub G, and Nauta HW. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA. 2001; 285: 2450-2451.
11. Heggie WT. Swimming with death: *Naegleria* infections in recreational waters. Travel Medicine and Infectious disease. 2010; 8: 201-206.
12. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and Clinical Review. 2012; Pathol Biol 60: 399-405.
13. da Rocha-Azebedo B, Tanowitz BH, Marciano-Cabral F. Diagnosis of infectious caused by pathogenic Free-Living Amoeba. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009:251406.
14. Zúñiga CI, Caro LJ. *Balamuthia mandrillaris* una ameba de vida libre altamente letal. Rev Enf Infect Ped. 2011; 24(96): 134-135.
15. Schuster LF. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free Living Amoebas. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3): 342-354.
16. Brindley N, Matin A, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. Experimental Parasitology. 2009; 121(3): 254-256.
17. Schuster FL, Honarmand S, Visvesvara GS, Glaser CA. Detection of antibodies against free-living amoebae *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* species in a population of patients with encephalitis. Clinical Infectious Diseases. 2006; 42(9):1260-1265.
18. Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DSC, Byers TJ, Fuerst PA. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1621-1625.
19. Booton G.C., Carmichael J.R., Visvesvara G.S., Byers T.J., Fuerst P.A. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41: 453-455.
20. Castro CA, Guerrero BOM. Técnicas de Diagnóstico Parasitológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica Costa Rica. 2004; 112pp.
21. de Jonckheere JF, Brown S. The identification of Vahlkamfiid amoeba by ITS sequencing protest. Protist. 2005; 156: 89-96.
22. Chinchilla M, Castro E, Alfaro M, Portilla E. Amebas de vida libre productoras de meningoencefalitis. Primeros hallazgos en Costa Rica. Rev Latinoam Microbiol. 1979; 21: 135-142.
23. Chinchilla M, Alfaro M, Marín RE, Guerrero OM, Portilla E. Amebas productoras de enfermedad en el hombre. Estudios Epidemiológicos en Costa Rica. Primeras Jornadas de investigación. 1981; 208-209.
24. Ehandi L, González D, Marín R. Aislamiento de amebas de vida libre capaces de producir meningoencefalitis. Rev Méd de Costa Rica y Centroamérica. 1994; 61(526): 11-14.
25. Morales JA, Chaves AJ, Visvesvara GS, Dubey JP. *Naegleria fowleri* associated Encephalitis in a cow from Costa Rica. Veterinary Parasitol. 2006; 139(1-3): 221-223.
26. Wagner A, Carolina M. Hallazgo de *Acanthamoeba* spp en biopsia cerebral de un paciente con adenocarcinoma metastásico. RINHRR 2011; 42(2): 56-59.
27. Arias L. (2014). Florida Child dies after contracting amoeba from Costa Rica hot springs. (consulta; 19 agosto 2014). (<http://www.ticotimes.net/>)
28. Peralta RM, Ayala OJJ. Amebas de vida libre en seres humanos. Salud Uninorter Barranquilla. 2009; 25(2): 280-292. ④

Artículos de investigación

Primer aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* en Costa Rica

Lissette Retana-Moreira^{1,2}, Elizabeth Abrahams-Sandi^{1,2}

1. Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

2. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica

Correo electrónico: lissette.retanamoreira@ucr.ac.cr

Resumen:

En este estudio se determinó la presencia de *Balamuthia mandrillaris* en una muestra de polvo procedente de una unidad combinada de emergencia en Costa Rica.

Se realizó un muestreo de polvo y agua en 12 unidades combinadas de emergencia instaladas en laboratorios de docencia. Las muestras fueron cultivadas en agar no nutritivo al 1,5% suplementado con *Escherichia coli*. Las amebas de vida libre aisladas a partir de estas muestras se identificaron morfológicamente y se realizó la caracterización molecular empleando una PCR que amplifica el gen mitocondrial 16S ARNr. La secuenciación del producto de PCR obtenido confirmó el aislamiento de *B. mandrillaris*, una ameba altamente patógena que produce principalmente cuadros a nivel de sistema nervioso central y piel.

A pesar de que el aislamiento de esta especie no se ha ligado a ningún caso clínico en Costa Rica, este reporte es de gran importancia pues representa el primer aislamiento de *B. mandrillaris* en América Central y el quinto aislamiento a nivel mundial a partir de una muestra ambiental.

Palabras claves: Amebas de vida libre, *Balamuthia mandrillaris*, duchas de emergencia, PCR

Introducción

Balamuthia mandrillaris es una ameba de vida libre (AVL) que pertenece al super grupo Amebozoa, familia Acanthamoebidae^(1,2). A diferencia de las especies del género *Acanthamoeba*, las cuales han sido aisladas de una gran variedad de ambientes, esta especie ha sido aislada de suelos^(3,4,5) y recientemente, de polvo⁽⁶⁾.

Diferentes especies de *Acanthamoeba* (ahora agrupadas en 18 genotipos⁽⁷⁾) y la única especie reportada del género *Balamuthia* (*B. mandrillaris*) son causantes de la encefalitis granulomatosa amebiana (GAE, por sus siglas en inglés), infectando ésta última tanto individuos inmunosupresos como inmunocompetes⁽⁶⁾. A la fecha, más de 200 casos de encefalitis por *Balamuthia* han sido reportados a nivel mundial, la mayoría de éstos en América Latina y Estados Unidos^(5,8): 55 casos se han reportado en Perú, 4 casos en Argentina, 4 casos en México, 1 caso en Brasil y 1 caso en Venezuela, sin reporte alguno de casos en América Central.

Además de la afección a sistema nervioso central, *B. mandrillaris* puede afectar piel, pulmones y riñones de seres humanos y animales^(5,9). Los aislamientos a partir de lesiones en piel son cada vez más frecuentes, considerándose ésta como una de las principales puertas de entrada al organismo. Después de un periodo variable de tiempo (que va desde algunos meses hasta años), la infección podría progresar, generando un cuadro de encefalitis que en la mayoría de los casos es mortal⁽⁵⁾.

A nivel de laboratorio, el diagnóstico de esta especie es difícil de realizar. La biopsia de tejido cerebral o de piel son las muestras requeridas para realizar el diagnóstico clínico. La observación de las amebas en cortes teñidos con hematoxilina eosina constituye el procedimiento más empleado en el laboratorio clínico. A diferencia de otras especies de AVL, *B. mandrillaris* es difícil de cultivar y requiere de medios de cultivo especiales y un tiempo de incubación mucho más prolongado debido al largo tiempo de generación que caracteriza a la ameba. Algunos laboratorios recomiendan el empleo de cultivos celulares, técnica que, sin embargo, se utiliza poco debido al crecimiento de hongos, bacterias y otros protistas contaminantes. Recientemente fue diseñada una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de género⁽⁶⁾, que puede ser empleada tanto con muestras ambientales (como suelos y polvo)^(3,4,5,6) como clínicas (tejido cerebral y algunas veces líquido cefalorraquídeo, aunque es raro el hallazgo de formas a partir de esta última muestra)^(9,10,11,12,13).

En la literatura existen reportes previos sobre el aislamiento e identificación de AVL en muestras recolectadas de diferentes puntos de las unidades combinadas de emergencia^(14,15,16). De acuerdo a estos

estudios, la presencia de AVL potencialmente patógenas en estos dispositivos, podría provocar infecciones severas cuando son utilizadas por un individuo que presente trauma o lesión a nivel de ojo o piel. Las unidades combinadas de emergencia son sitios donde es común el aislamiento de estas amebas, debido a que acumulan mucho polvo, humedad y generalmente, los sitios donde son instaladas a menudo no cuentan con un protocolo de limpieza continuo para las mismas.

En este trabajo se informa sobre el primer aislamiento de *B. mandrillaris* en el polvo de una unidad combinada de emergencia en Costa Rica. La publicación de este aislamiento es importante debido a que, además de ser la primera vez que se informa sobre la presencia de esta especie en el país, éste corresponde al quinto aislamiento de *B. mandrillaris* nivel mundial a partir de una muestra ambiental.

Materiales y métodos

Muestreo

Se recolectaron 24 muestras de polvo y 12 muestras de agua de cabezales de ducha, cabezales de lava ojos y reservorios de 12 unidades combinadas de emergencia (Figura 1)⁽¹⁷⁾, localizadas en la Universidad de Costa Rica. Las muestras fueron colectadas con torundas y pipetas pasteurizadas estériles, respectivamente. Las torundas estériles se sumergieron y lavaron en 3 mL de solución Page estéril. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y aproximadamente 200 µL del sedimento se inocularon en placas de agar nutritivo al 1,5% suplementadas con *Escherichia coli*. Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días y posteriormente a temperatura ambiente durante más de 3 semanas.

Observación microscópica

La presencia de AVL se observó con un microscopio invertido (Olympus CK30). La identificación inicial se basó en la observación de las formas y apariencia de los trofozoítos y tipo de pseudópodos emitidos⁽¹⁸⁾.

Extracción de ADN y análisis moleculares

Para la extracción de ADN se empleó el método descrito por Reyes-Battle *et al*⁽¹⁹⁾. La concentración de ADN extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro Nano Drop 1000 (Fisher-Scientific, España).

Para la identificación de especie se realizó la amplificación del gen 16S ADNr de *B. mandrillaris* según método descrito por Niyiyati *et al*⁽⁶⁾. Los primers empleados fueron F-Balspec16S y R-Balspec 16S. Como controles positivos se utilizaron la cepa ID-19 de *Balamuthia* strain ID-19

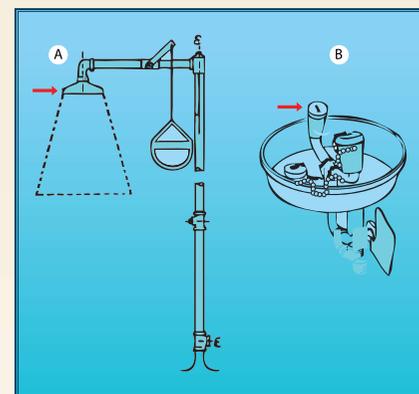


Figura 1. Diagrama de una unidad combinada de emergencia⁽¹⁷⁾. A: ducha, se señala con una flecha el cabezal de ducha; B: lava ojos, se señala con flechas el cabezal de lava ojos (flecha continua) y el reservorio (flecha discontinua)

y la cepa ATCC *Balamuthia mandrillaris* CDC/V451 (ATCC PRA-291), como control negativo se utilizó agua destilada.

Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Alemania), y se secuenciaron en ambas direcciones. La secuenciación se realizó en el secuenciador automático MegaBACE 1000 (Healthcare Biosciences, España) Las secuencias se editaron y alinearon usando el software Mega 5.0⁽²⁰⁾.

Resultados y discusión

Trofozoítos de aproximadamente 25 a 30 µm, polimórficos, con un solo núcleo, con varios pseudópodos y de movimiento muy lento, se observaron dentro de la capa de agar, aislados a partir de una muestra de polvo. Las características morfológicas observadas fueron similares a las descritas para el género *Balamuthia*⁽¹⁸⁾.

La posterior identificación de la ameba como *B. mandrillaris* fue confirmada con la reacción de PCR (Figura 2). El análisis de la secuencia obtenida y la comparación con las secuencias disponibles de otros aislamientos de *B. mandrillaris* en el GenBank reveló un 97% de homología entre las secuencias.

Este estudio es el primero donde se aísla e identifica *B. mandrillaris* en Costa Rica, es la segunda vez a nivel mundial donde se realiza el aislamiento a partir de una muestra de polvo y constituye el quinto aislamiento a partir de muestras ambientales. Cabe anotar que, a pesar de que el aislamiento de esta especie se ha realizado en diferentes países^(4,5,6), solamente en un caso se logró

asociar la presencia la ameba con la muerte de un niño por un cuadro a nivel de SNC⁽⁵⁾.

El hallazgo de esta ameba a partir de una muestra de polvo indica que posiblemente el riesgo de una infección por este agente no se limita al contacto con el suelo⁽⁶⁾, aspecto que debe ser considerado cuando se estudia la epidemiología de este agente infeccioso. A pesar de que el aislamiento de esta especie en Costa Rica no se ha ligado a ningún caso clínico, su hallazgo advierte el posible riesgo de infección y pone de manifiesto la necesidad de contar con un protocolo de limpieza y mantenimiento adecuado de unidades como las analizadas en este estudio. Además del potencial riesgo que podría representar la presencia de *B. mandrillaris* en este tipo de equipos de bioseguridad, hay que anotar la posibilidad del aislamiento de otras amebas de vida libre reportadas con mayor frecuencia en la naturaleza, como es el caso de los genotipos del género *Acanthamoeba*. Algunas investigaciones reportan la presencia de los miembros de este género hasta en el 48% de las muestras recolectadas⁽¹⁵⁾. En el caso del aislamiento de estos organismos, es importante realizar pruebas adicionales que evalúen el potencial patogénico de los mismos, ya que algunos genotipos son considerados no patógenos para el ser humano y animales.

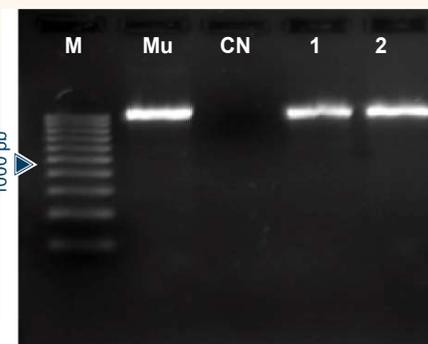


Figura 2. Producto de la PCR para *B. mandrillaris*, aislada a partir de una muestra de polvo. M: marcador de peso molecular, Mu: muestra, CN: control negativo, 1-2: controles positivos (*Balamuthia* strain ID-19 y *Balamuthia mandrillaris* CDC/V451)

como *Pseudomonas* sp., *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycobacterium avium*, entre otras^(15,23).

Conclusiones

A pesar de que se reporta un número relativamente bajo de infecciones por *B. mandrillaris*, se considera que la frecuencia del reporte de los casos está

subestimada. El comportamiento fastidioso de esta ameba bajo condiciones de laboratorio limita el estudio de características biológicas y de distribución de esta especie. Este primer aislamiento en Costa Rica debe llamar la atención de los profesionales en salud sobre la presencia de esta ameba y su posible riesgo de infección, además de servir como base para que se realicen otros estudios sobre diferentes especies de AVL, sobre todo si se cuenta con las herramientas para realizar el aislamiento y la identificación tanto morfológica como molecular de estos organismos.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado financiado del proyecto 803-B4-050, de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Un agradecimiento especial al Servicio de Secuenciación SEGAI de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España, por el servicio de secuenciación brindado al estudio.

Referencias

1. Amaral Zettler L.A., Nerad T.A., O'Kelly C.J., Peglar M.T., Gillevet P.M., Silberman J.D., Sogin M.L. A molecular reassessment of the leptomixid amoebae. *Protist*. 2000; 151: 275-282.
2. Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2005; 5: 399-451.
3. Schuster F.L., Dunnebacke T.H., Booton G.C., Yagi S., Kohlmeier C.K., Glaser C., Vugia D., Bakardjiev A., Azimi P., Maddux-Gonzalez M., Martinez A.J., Visvesvara G.S. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amoebic encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 3175-3180.
4. Dunnebacke T.H., Schuster F.L., Yagi S., Booton G.C. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology*. 2004; 150: 2837-2842.
5. Cabello-Vilchez A.M., Reyes-Battle M., Montalbán-Sandoval E., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Elias-Letts R., Guerra H., Gotuzzo E., Martínez-Carretero E., Piñero J.E., Maciver S.K., Valladares B., Lorenzo-Morales J. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from

environmental sources in Perú. *Parasitology Research*. 2014; 113: 2509-2513.

6. Niyati M. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitology Research*. 2009; 106: 279-281.
7. Qvarnstrom Y., Nerad T.A., Visvesvara G.S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n.sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2013; 60: 626-633.
8. Booton G.C., Carmichael J.R., Visvesvara G.S., Byers T.J., Fuerst P.A. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 453-455.
9. Yagi S., Booton G.C., Visvesvara G.S., Schuster F.L. Detection of *Balamuthia* mitochondrial 16S rRNA gene DNA in clinical specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43: 3192-3197.
10. Tavares M., Correia da Costa J.M., Carpenter S.S., Santos L.A., Afonso C., Aguiar A., Pereira J., Cardoso A.I., Schuster F.L., Yagi S., Sriram R., Visvesvara G.S. Diagnosis of first case of *Balamuthia* amoebic encephalitis in Portugal by immunofluorescence and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44: 2660-2663.
11. Yagi S., Schuster F.L., Visvesvara G.S. Demonstration of *Balamuthia* and *Acanthamoeba* mitochondrial DNA in sectioned archival brain and other tissues by the polymerase chain reaction. *Parasitol Research*. 2008; 102: 491-497.
12. Bando Y., Takahashi T., Uehara H., Kagegi T., Nagahiro S., Izumi K. Autopsy case of amoebic granulomatous meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* in Japan. *Pathology International*. 2012; 62: 418-423.
13. Krasaelap A., Prechawit S., Chansaenroj J., Punyahotra P., Puthanakit T., Chomtho K., Shuangshoti S., Amornfa J., Poovorawan Y. Fatal *Balamuthia* Amoebic Encephalitis in a Healthy Child: A Case Report with Review of Survival Cases. *Korean Journal of Parasitology*. 2013; 51: 335-341.
14. Tyndall R.L., Lyle M.M., Ironside K.S. The presence of free-living amoebae in portable and stationary eyewash stations. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 1987; 48: 933-934.
15. Paszko-Kolva C., Yamamoto H., Shahamat M., Sawyer T.K., Morris G., Colwell R.R. Isolation of amoebae and *Pseudomonas* and *Legionella* spp. from eyewash stations.

Applied and Environmental Microbiology. 1991; 57: 163-167.

16. Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F., and Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and Clinical review. *Pathologie Biologie*. 2012; 60: 399-405.
17. Modificado de "Duchas de emergencia". 2014. En internet: http://www.paritarios.cl/especial_duchas_de_emergencia.htm.
18. Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2007; 50: 1-26.
19. Reyes-Battle M., Todd C., Martín-Navarro C., López-Arencibia A., Cabello-Vilchez A.M., González A.C., Córdoba-Lanús E., Lindo J.F., Valladares B., Piñero J.E., Lorenzo-Morales J. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*. 2014; 113: 1383-1388.
20. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28: 2731-2739.

21. Tanveer T., Hameed A., Muazzam A.G., Jung S.Y., Gul A., Matin A. Isolation and molecular characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotypes from diverse water resources including household drinking water from Khyber Pakhtunkhwa. *Pakistan Parasitology Research*. 2013; 112: 2925-2932.
22. Lass A., Szostakowska B., Idzinska A., Chomicz L. The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated from natural water reservoirs in Poland. *Parasitology Research*. 2014; 113: 2693-2699.
23. Schmitz-Esser S., Toenshoff E.R., Haider S., Heinz E., Hoenninger V.M., Wagner M., Horn M. Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental. 



AVISOS DEL COLEGIO

Nuevas cuotas de colegiatura y laboratorio a partir de marzo de 2014

Se avisa a los colegiados que conforme al artículo XLIII del Reglamento Interno del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, corresponde aplicar el aumento automático de la colegiatura y cuota de laboratorio.

En el acuerdo 23 de la sesión de Junta Directiva N°39:2013-2014 del 27 de enero del 2014, se acuerda aplicar este aumento.

En sesión N°40:2013-2014 del 3 de febrero de 2014, se calcula el aumento así:

Colegiatura **€11.670**
Laboratorio **€5.835**

Ambas rigen a partir del mes de marzo de 2014.

Estimad@s colegiados

Le recordamos que en forma continua se debe de actualizar la base de datos de nuestro Colegio. Por tal razón les solicitamos realizar la actualización en la fórmula que se ha elaborado para ese fin, que puede solicitarse al correo del Colegio colmq@racs.co.cr a través del fax 2225-5138 

AVISO DE MOROSIDAD

Se les recuerda a todos los microbiólogos del país la obligatoriedad del pago puntual de la Colegiatura, según el artículo 15 de la Ley Constitutiva del CMQC-Ley 771.
El incumplimiento de este artículo lleva al estado de morosidad y suspensión de la licencia de trabajo. 