

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

10  
2ej.

CARACTERIZACION BIOLOGICA DE UNA AMEBA DE  
VIDA LIBRE PATOGENA AISLADA DE UN PACIENTE  
CON MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA  
EN EL ESTADO DE PUEBLA, MEXICO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :  
ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA

MEXICO, D. F.

1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Página

<b>I. Resumen</b> .....	1
<b>II. Introducción</b> .....	2
Historia .....	3
Taxonomía .....	5
Ecología .....	6
Enfermedades .....	8
Farmacología .....	12
Estado actual del problema .....	15
Importancia del género Hartmannella .....	18
Reporte clínico del caso .....	20
<b>III. Objetivos</b> .....	23
<b>IV. Material y Métodos</b> .....	24
Aislamiento y cultivo .....	24
Tolerancia a la temperatura .....	26
Identificación .....	26
Transformación amebo flagelar .....	26
Microscopía de luz .....	27
Morfometría .....	27
Tinciones .....	27
Ultraestructura .....	28
Isoelectroenfoque .....	28
Pruebas de patogenicidad .....	29
Histología .....	30
División celular .....	31
Sensibilidad a fármacos .....	32
<b>V. Resultados</b> .....	34
<b>VI. Discusión</b> .....	45
<b>VII. Conclusiones</b> .....	55
<b>VIII. Referencias</b> .....	60
<b>IX. Apéndice</b> .....	66

## RESUMEN

En este trabajo se documenta un caso de meningoencefalitis causado por una ameba del género *Hartmannella* en un paciente masculino de 18 años en Tehuacán Estado de Puebla.

En febrero de 1990, quince días después de una insidiosa iniciación de la enfermedad, el paciente fue internado en el Hospital Universitario de Puebla (HUP) presentando cefalea severa, rino-faringitis, fiebre, náusea, vómito e hipertensión. Como antecedentes importantes se anotó que el paciente tenía desnutrición en grado I y que previamente había tenido contacto repetido con agua templada en una pileta utilizada para mojar piedra de alabastro donde metía la cabeza para refrescarse mientras trabajaba como artesano.

El tratamiento incluyó antipiréticos, analgésicos, antihistamínicos y antibióticos incluyendo ampicilina, cloranfenicol, gentamicina y estreptomycin. El paciente no mostró mejoría y su condición empeoró. En el Hospital de Puebla se reportó el diagnóstico de meningoencefalitis bacteriana pese a que el examen para bacterias fue negativo.

Sin embargo, durante este período resultaron positivas 3 muestras del líquido cefalorraquídeo (LCR) para trofozoitos amebianos, se hizo un nuevo diagnóstico de meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) y se sugirió al HUP el tratamiento con anfotericina B que nunca fue efectuado. El paciente falleció dos meses y medio después de iniciado su padecimiento.

Se realizó una caracterización biológica y un estudio completo de la cepa amebiana aislada del LCR del paciente para determinar su ubicación taxonómica, al momento se ha determinado que la cepa no es *Naegleria fowleri* (el organismo típico causante de meningoencefalitis amebiana), sino una ameba de la Familia Hartmannellidae. Este es el primer caso de MEAP producido por una *Hartmannella*, que se ha documentado científicamente.

---

## INTRODUCCION

---

Las amebas pequeñas de vida libre están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden contaminar hábitats artificiales como piscinas (De Jonckheere, 1979), estanques y bebederos (John, 1985; Rivera, *et al.* 1989). Esto representa un peligro potencial para el usuario de estos cuerpos de agua, porque estas amebas pueden ser patógenas para el humano, causándole daño cerebral, afecciones auditivas, pulmonares, oculares y de la piel.

En los últimos años las amebas de vida libre patógenas han provocado un gran interés (Jadin, 1972) debido a que se las ha relacionado con enfermedades severas (Rivera, *et al.* 1986) que incluso pueden llevar al hombre a la muerte (De Jonckheere, 1984).

Esto adquiere relevancia si se considera que las amebas de vida libre incluidas entre ellas las especies patógenas pueden encontrarse con relativa facilidad en cuerpos de aguas de casi cualquier tipo como piscinas, aguas termales de uso recreacional, incluso y de manera sorprendente en aguas embotelladas (Rivera *et al.*, 1981), y agua potable (Rivera *et al.*, 1979).

Las temperaturas elevadas favorecen el crecimiento y la proliferación de estas amebas por lo que en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales, aparecen con más frecuencia (Cerva, 1977; De Jonckheere, 1977 y 1981; Rivera *et al.*, 1985).

El estudio de las amebas de vida libre ha demostrado que existe un grupo muy restringido de estos organismos que pueden

provocar infecciones que afectan al hombre y que ameritan su consideración. Ese grupo se circunscribe principalmente a los géneros amebianos *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Vahlkampfia* sp. y *Leptomyxa* sp. Sin embargo, y como se describe en este trabajo, las amebas del género *Hartmannella* pueden ser incluidas a la luz de este trabajo en este grupo de organismos patógenos.

Las amebas patógenas de vida libre de las especies *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *Leptomyxa* sp. son capaces de provocar en el hombre dos enfermedades mortales:

- Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP)
- Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG)

También pueden provocar infecciones muy severas en otros órganos como son pulmón, ojos y oídos (Rivera, et al., 1984; Mascaró, 1986; Martínez, 1980).

## HISTORIA

Hacia el año de 1841 Félix Dujardin, eminente naturalista francés describió por vez primera la presencia en el ambiente de unos pequeños organismos ameboideos de forma alargada a los cuales les dio el nombre de amebas limax. En este momento se inicia aunque de manera discreta, el estudio de las amebas pequeñas de vida libre (Martínez, 1985).

Años después, Singh en 1952, describe dos grandes grupos de amebas basándose en sus características de división nuclear a las cuales incluyó en las familias Hartmannellidae y Vahlkampfiidae. Es importante hacer notar en este punto que durante muchos años se incluyeron dentro de la familia Hartmannellidae a la mayoría de las especies de amebas del género *Acanthamoeba* conocidas actualmente.

Sin embargo, debido a que a partir de ese momento se empezaron a establecer criterios de clasificación más estrictos y basados en nuevas técnicas las acanthamebas se separaron de las hartmannellas. En años recientes se han reportado trabajos notables y más abundantes sobre la ecología (Kyle, 1985),

taxonomía, bioquímica y demás aspectos de la biología de estos organismos (Page, 1988).

En 1964 Culbertson encontró casualmente un organismo amebiano que había contaminado algunos de los medios de cultivo con los que estaba trabajando en ese momento. Al hacer pruebas con estas amebas encontró sorpresivamente que estos organismos, causaban la muerte de organismos de laboratorio y dedujo que posiblemente fueran también patógenos para el humano.

La suposición de Culbertson fue comprobada más tarde cuando en 1965, en Australia, Fowler y Carter registraron el primer reporte de una infección fatal de Meningoencefalitis producida por una ameba de vida libre semejante a la reportada por Culbertson en 1964. Un año después Butt (1966) en Florida, Estados Unidos, reconoció otro caso y dio el nombre de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) a esta nueva enfermedad.

En 1970 Carter publicó los primeros casos de meningoencefalitis en humanos debidamente comprobados. En ese momento todos los casos comprobados de MEAP se debían a *Naegleria fowleri*. Los primeros en reconocer casos de Meningoencefalitis causados por amebas del género *Acanthamoeba* fueron Kenney en 1971, Jager y Stamm en 1972 y Robert y Rorke en 1973, con lo que las diferencias clínico-patológicas empezaron a emerger. A medida que la enfermedad se fue conociendo más, se encontró que algunas infecciones oculares y de la piel eran causadas por este tipo de amebas (Martínez, 1985).

En 1981 Martínez denominó a la enfermedad producida por *Acanthamoeba* spp. como Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG), para diferenciarla de la MEAP debida a *Naegleria fowleri*.

En 1966 Page inició sus trabajos sobre la taxonomía de las amebas pequeñas y redefinió los géneros *Hartmannella* Alexieff, 1912 y *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931. En 1967 Page completó sus estudios y en 1974 describió 8 especies nuevas. Estos estudios fueron básicos para la clasificación de estas amebas a las que llamó amebas anfizoicas por su capacidad de vivir en forma libre en el ambiente y además pasar como parásito a un organismo vivo.

## TAXONOMIA

Desde el inicio del estudio de las amebas de vida libre se han propuesto varias clasificaciones, basadas principalmente en aspectos morfológicos. Sin embargo, debido a que las características morfológicas son comunes para muchas amebas, éstas no permiten tener un criterio claro para clasificarlas, es necesario tomar en cuenta otros criterios, como propiedades inmunológicas, crecimiento, características nutricionales, patrones enzimáticos, composición bioquímica, ultraestructura, tolerancia a la temperatura, mitosis, movilidad, virulencia y biología molecular (De Jonckheere, 1984).

En 1952 Singh propone una clasificación que se basa en la estructura nuclear y patrones de división durante la mitosis, reconociendo los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmannella* por su locomoción y su comportamiento.

Debido a que las amebas incluidas en estos géneros se dividen por mesomitosis, Singh las coloca en la familia Hartmannellidae y en el género *Hartmannella*.

Por otra parte, Page en 1966 propuso una clasificación basada en la forma de locomoción, características citológicas, estructuras nucleares, patrón de división durante la mitosis, ultraestructura, nutrición y características inmunológicas.

Page en 1988 separó el género *Acanthamoeba* del género *Hartmannella* con base a su locomoción, formación de acantópodos y morfología del quiste. Esta clasificación no considera la patogenicidad como un carácter distintivo.

La clasificación de amebas de vida libre propuesta por Chang en 1971, es una combinación de la de Singh y Page y está basada en principios filogenéticos. Sin embargo el sistema taxonómico, en lo general más aceptado y que describe con precisión el lugar que ocupan las amebas en el grupo de los protozoarios corresponde a Lee (1988) y se muestra en la figura 1.

**Reino Protista**

*Haecel, 1866*

**Subreino Protozoa**

*Goldfuss, 1818, enmend Von Siebold, 1846*

**Phylum Sarcomastigophora**

*Honigberg & Balamuth, 1963*

**Subphylum Sarcodina**

*Schmarda, 1871*

**Superclase Rhizopodea**

*Von Siebold, 1845*

**Clase Lobosea**

*Carpenter, 1861*

**Subclase Gymnamoebia**

*Haecel, 1862*

**Orden Amoebida**

*Kent, 1880*

**Suborden Tubulina**

*Dovee & John, 1966*

**Familia Hartmannellidae**

*Volkonsky, 1931, enmend Page, 1974*

**Género Hartmannella**

*Alexeff, 1912, enmend. Page, 1974*

Fig. 1. Ubicación taxonómica de la cepa PT-1 según Lee et al, 1988

## ECOLOGIA

Aparte de la descripción de los signos y síntomas de los individuos que han muerto por infecciones de amebas de vida libre, se necesita conocer más sobre los agentes causales, dónde y cómo viven, cómo se transportan y cuáles son las condiciones para el desarrollo de la infección.

Estas amebas se han aislado de diferentes tipos de agua: de reservorios naturales, de grifos, de agua mineral embotellada, termal y de desecho.

También se las ha encontrado en líquido cefalorraquídeo, en la región nasobucofaríngea, en pacientes con rinitis crónica, en pacientes con quemaduras y en la atmósfera de la Ciudad de México y su área Metropolitana. Las amebas son habitantes comunes del suelo, en él juegan un papel muy importante dentro del ciclo de los nutrientes, porque estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa vegetal.

El enquistamiento es la manera como las amebas responden a cualquier variación ambiental que amenace su existencia. De esta forma, pueden sobrevivir a las sequías, a los cambios de pH, a la falta casi total de oxígeno y a la escasez de alimento (Neal, 1963). En su forma de quiste, las amebas de vida libre pueden ser acarreadas hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas adiabáticas de aire. El tiempo y la distancia a la que pueden transportarse depende de la altura y del tamaño que posean.

En general, las partículas de un diámetro mayor de 20  $\mu\text{m}$  sedimentan casi de inmediato y su área de distribución es aproximadamente de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que las partículas de 10-20  $\mu\text{m}$  pueden permanecer por un tiempo mayor y dispersarse más ampliamente.

Lo anterior tiene importancia porque la mayoría de las especies de amebas de vida libre tienen tamaños que se distribuyen en el intervalo de 6 a 15  $\mu\text{m}$ . Los principales factores que afectan la sobrevivencia de cualquier microorganismo transportado por el

aire son la exposición a los rayos ultravioleta y a la sequía, los que en conjunto son responsables de la eliminación de la mayoría de los microbios que ingresan a la atmósfera. Sin embargo, los quistes, que son la forma más común de formas en el ambiente aéreo, pueden sufrir su inactivación debido a las interacciones con los contaminantes del aire, aunque estos también podrían reforzar su sobrevivencia al servirles de nutrientes o al menos de agentes protectores contra otros químicos atmosféricos.

Las amebas de vida libre pueden llegar a los cuerpos de agua, a los alimentos y a las heridas superficiales en forma de trofozoito o de quiste, a través del aire. También los cuerpos de agua que contienen grandes cantidades de microorganismos pueden arrojarlos al aire por la formación de aerosoles. Dentro de los cuerpos de agua las amebas viven sobre la superficie, adheridas a partículas flotantes, en la columna de agua, o en los sedimentos.

En general las amebas de vida libre viven en las interfases agua-aire, suelo-aire, agua-suelo o agua/aire-organismos, a donde llegan desplazándose por el gradiente pues en estas zonas se acumula la mayor cantidad de materia orgánica y de bacterias.

En el caso de la interfase aire-organismo, las amebas se alimentan de los exudados y de las bacterias adheridas a la superficie. Las temperaturas extremas para las amebas de vida libre son las que están por abajo de los 4°C o por encima de los 37°C. Algunas amebas termotolerantes pueden sobrevivir incluso a temperaturas mayores de 45°C, aunque por lo general, las especies patógenas son termotolerantes, no todas las amebas que crecen a más de 40°C son patógenas (Rivera, *et. al.*, 1983). Por lo anterior los cuerpos de agua que tienen temperaturas estables por encima de los 35°C son lugares ideales para la sobrevivencia y el desarrollo de las especies patógenas (Kyle, 1986 y 1987).

Aunque las amebas de vida libre patógenas tienen velocidades de crecimiento inferiores a las no patógenas, las primeras pueden crecer e incrementar paulatinamente su número hasta llegar a niveles infectivos ante la escasez de competidores. Así los cuerpos de agua contaminada térmicamente ofrecen un lugar libre de competencia, materia orgánica en abundancia y un nicho "vacío" de ameboflagelados, con escasa o nula depredación. Podría hacerse un símil con el cerebro de los vertebrados, en donde las

amebas encuentran un ambiente con temperatura estable, con abundante alimento, sin competencia y con una escasa presión depredadora por parte de los leucocitos.

El intervalo de pH que las amebas pueden soportar está entre 5.5 y 8.6. Solamente las especies de *Acanthamoeba* son tolerantes a los cambios de salinidad de las aguas cuando están en su forma trófica y el quiste es resistente al ataque del cloro. Esta puede ser una de las razones que hagan infectantes oportunistas a las especies de este género.

En los estudios sobre la dinámica de las poblaciones de las especies patógenas de *Naegleria* y *Acanthamoeba* aún no se han encontrado correlaciones con la cantidad de materia orgánica, con las poblaciones de bacterias coliformes, ni con los factores físicoquímicos. La única correlación existente es con la estación más calurosa del año.

#### **ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR AMEBAS DE VIDA LIBRE PATOGENAS**

Las amebas de vida libre patógenas provocan en el hombre dos trastornos que afectan al sistema nervioso: La meningoencefalitis amebiana primaria o naegleriamebiasis y la encefalitis amebiana granulomatosa o acanthamebiasis, ambos trastornos son de naturaleza fatal y difieren en agente etiológico, patogenicidad, sitios de daño, curso y manifestaciones clínicas (Červa, 1968).

La MEAP es una enfermedad que lleva invariablemente a la muerte y se produce por una infección debida a amebas de la especie *Naegleria fowleri* (Carter, 1970; Rutherford, 1986). Esta enfermedad ha sido reportada en muchos países como Bélgica, Checoslovaquia, Gran Bretaña, Australia, Estados Unidos, Venezuela, Panamá y México (Rivera et al., 1984). La mayoría de los casos han tenido como antecedente la natación, en época calurosa, de individuos sanos y jóvenes.

Las amebas penetran la mucosa nasal y llegan al cerebro a través de los nervios olfatorios, una vez en el cerebro el proceso causa inflamación y daño extenso al tejido nervioso. La invasión de las amebas es de la superficie hacia el centro del cerebro. El

padecimiento es de desenlace rápido y fatal, produciéndose la muerte dentro de las 72 horas después de la aparición de los síntomas (Martínez, 1985; Rivera et al., 1984).

Sólo existe en la actualidad un tratamiento para la MEAP, la anfotericina B. Otros medicamentos utilizados son ineficaces en la infección por *Naegleria*.

Los principales síntomas de la enfermedad son: cefalea intensa, vómito, fiebre (39-40 °C), rigidez en la nuca, anorexia, náuseas, cambios en el comportamiento, afasia, convulsiones, coma y finalmente sobreviene la muerte (Martínez, 1985).

#### Cuadro Clínico.

La meningoencefalitis amebiana primaria en el hombre tiene como agente causal a *Naegleria fowleri*. A nivel experimental *Naegleria australiensis* provoca un cuadro parecido a la meningoencefalitis amebiana primaria que se caracteriza por ser menos agresivo e incluso puede convertirse en un proceso crónico subagudo. El período de incubación varía de dos días a tres semanas dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia del organismo invasor.

La aspiración de agua o aire que contengan amebas hace llegar a estos microorganismos a las cavidades nasales, al ponerse en contacto con el epitelio olfatorio de la mucosa pituitaria, atraviesan el neuroepitelio olfatorio, penetrando a la cavidad craneal. Una vez que pasan a través de los orificios de la lámina cribosa; quistes y trofozoítos pueden llegar por este medio a entrar en contacto con el bulbo olfatorio. Toda esta zona se encuentra altamente vascularizada constituyendo así la ruta de disseminación de las amebas a otras partes del encéfalo.

Dado que la invasión es muy rápida hay destrucción de prácticamente todo el encéfalo, mediante necrosis hemorrágica. La encefalitis amebiana primaria se caracteriza por la manifestación súbita de cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, náusea, vómito en proyectil y datos de irritación meníngea y encefalitis.

El curso clínico se caracteriza fundamentalmente por confusión mental, coma y en algunos casos crisis convulsivas; hay otras manifestaciones como anorexia, diplopia, visión borrosa, trastornos del gusto, del olfato y alucinaciones. A la exploración clínica se encuentra un síndrome de hipertensión endocraneana, rigidez de nuca, signos de Kernig, Brudzinski y de Babinski; es frecuente encontrar parálisis de oculomotores y marcha atáxica.

La muerte sobreviene en el curso de días dependiendo del manejo y resistencia del paciente así como de la virulencia del microorganismo invasor.

El cuadro clínico es muy parecido a la meningoencefalitis bacteriana, sin embargo, en la infección por *Naegleria* existe el antecedente de que los pacientes en su mayoría jóvenes, previamente sanos, nadaron en algún cuerpo de agua. El hecho de encontrar escaso exudado purulento y ausencia de bacterias en líquido cefalorraquídeo debe hacernos pensar en meningoencefalitis amebiana primaria.

#### DIAGNOSTICO

El diagnóstico se confirma con el aislamiento de las amebas del líquido cerebroespinal o del tejido de biopsia cerebral. Macroscópicamente hay una amplia destrucción dada por infartos hemorrágicos que se extienden desde la base del polo frontal del cerebro, edema intenso y aplanamiento de surcos y fisuras, congruentes con una presión endocraneal muy elevada; las lesiones abarcan tanto la sustancia gris como la blanca, los nervios craneales están envainados por un exudado sanguinolento, hay leptomeningitis basal con exudado purulento escaso y daño a hipófisis y estructuras paraselares (Martínez, 1977).

El estudio microscópico, muestra abundante infiltrado con predominio de leucocitos polimorfonucleares algunos eosinófilos y mononucleares, hay angéctis necrotizante y necrosis fibrinoide y se encuentran amebas en la vecindad de vasos sanguíneos.

Únicamente se encuentran trofozoitos y no quistes, en las áreas más afectadas puede haber focos de desmielinización.

La encefalitis amebiana granulomatosa o acanthamebiasis tiene como agente etiológico a:

*Acanthamoeba castellanii*  
*Acanthamoeba culbertsoni*  
*Acanthamoeba polyphaga*  
*Leptomyxa* sp. y  
*Vahlkampfia* sp.

El período de incubación se desconoce pero son necesarios semanas o meses para que la enfermedad se establezca. La puerta de entrada puede ser a través de la piel o mucosas así como la aspiración de agua o aire contaminadas con amebas o quistes de las mismas. Una vez en el organismo se establece una lesión primaria desde la cual por vía hematogéna alcanza el sistema nervioso central.

A diferencia de *Naegleria*, *Acanthamoeba* presenta un curso de invasión lento y preferentemente afecta ganglios basales y las lesiones se caracterizan por ser granulomatosas y al establecerse paulatinamente provocan una encefalomalacia encontrando en ellas tanto trofozoítos como quistes.

Se presenta un largo curso clínico con parestesias o crisis convulsivas dependiendo del sitio que se encuentre irritado o dañado. Los datos clínicos comparados con los que provoca *Naegleria* son menos intensos y de un curso más lento, esta enfermedad se da en pacientes crónicamente debilitados por otra enfermedad o en pacientes inmunodeprimidos, por lo que *Acanthamoeba* se comporta como oportunista.

Los datos clínicos son: confusión mental de diverso grado, cefalea, fiebre de menor intensidad que en la naegleriamebiasis, irritación meníngea, náusea y vómito. Una vez instalado el síndrome de hipertensión endocraneal, fotofobia, diplopia, alteraciones auditivas y trastornos del ritmo sueño-vigilia finalizando en coma. El cuadro clínico puede confundirse con tuberculosis cerebral, afecciones virales y absceso cerebral. Sin embargo, los antecedentes del paciente así como un cuadro respiratorio bajo y la rebeldía al tratamiento del proceso debe hacernos pensar en acanthamebiasis, un dato importante para sospechar el diagnóstico, es la presencia de nódulos cutáneos.

Los estudios radiológicos como la tomografía computarizada muestran múltiples zonas con densidad disminuida tanto en corteza como en parénquima que corresponden a infartos cerebrales y embolias sépticas.

El aislamiento de la ameba y del quiste de las lesiones o del líquido cerebroespinal confirman el diagnóstico siendo también posible aislar el microorganismo de los nódulos o lesiones cutáneas.

Macroscópicamente se encuentran áreas de encefalomalacia hemorrágica sobre todo en la base encefálica y estructuras de fosa craneal posterior. Es frecuente encontrar lesiones cutáneas, pulmonares y oculares debidas a *Acanthamoeba*.

El estudio histológico muestra encefalitis necrosante hemorrágica, granulomas e inflamación granulomatosa con abundantes mononucleares, histiocitos y células gigantes de cuerpo extraño, leptomeningitis crónica pronunciada en las lesiones corticales, angitis con invasión de los vasos sanguíneos por las amebas. Se encuentran tanto trofozoítos como quistes, en tejido nervioso como en otros tejidos.

#### FARMACOLOGIA

En la actualidad existe una gran cantidad de información sobre el tema, sabemos mucho acerca de esas amebas, sin embargo, carecemos de un tratamiento adecuado para controlar la infección de manera efectiva en cualquiera de sus fases.

Se hacen esfuerzos para controlar las tres enfermedades causadas por amebas patógenas de vida libre, sin embargo, se han tenido poco éxito.

Las tres enfermedades bien definidas por los organismos antes mencionados son:

Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) cuyo agente causal es *Naegleria fowleri*; encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) producida por *Acanthamoeba* spp. y más recientemente

se han identificado ciertos tipos de acantamebas como los agentes causales de queratitis amebiana crónica (QAC).

Se han hecho varios intentos por identificar los agentes terapéuticos más efectivos para controlar las infecciones amebianas por *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Para ello se han incluido antibióticos del grupo de los bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, desinfectantes, etc.

El comportamiento de los agentes infecciosos a los diferentes antibióticos es muy variable, inclusive algunos de estos antibióticos tienen efectos diferentes en amebas de la misma especie en pacientes diferentes (Martínez 1985).

Los comentarios que se harán acerca del efecto de diferentes fármacos sobre las amebas de vida libre se pueden dividir en dos grupos, para acantamebas y para naeglerias, dado que hasta la fecha sólo se ha reportado a los organismos de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* como los principales organismos capaces de producir infecciones de desenlace fatal en humanos. *Vahlkampfia* y *Leptomyxa* han mostrado ser patógenas (Jaramillo, et al., 1989; Martínez, 1979; Visvesvara, 1990; Taratuto, 1991), y no se han hecho ensayos terapéuticos en estos especímenes y tampoco se han probado en *Hartmannella*.

#### *Acanthamoeba.*

Culbertson (1958) hizo los primeros intentos para combatir las infecciones por amebas de vida libre producidas por acantamebas y naeglerias desde el mismo momento en que se aislaron estos organismos. Esto sucedió en el año de 1958 por En ese momento se probó la actividad terapéutica de la sulfadiazina, sulfamerazina y sulfapiridina constatando que la sulfadiazina era la más efectiva contra las amebas en ratones de laboratorio.

Ensayos más finos realizados también en animales de laboratorio mostraron que la sulfadiazina aplicada aproximadamente 20 horas después de iniciada la infección en dosis de 200 mg/kg/día resulta ser efectiva como lo habían demostrado los experimentos de Culbertson, sin embargo si el tratamiento es iniciado dos o tres días después, la eficacia de la sulfadiazina

desciende notablemente; más aún, después del cuarto día se pierde completamente la efectividad.

Otros antibióticos probados en contra de acantamebas aisladas de casos clínicos son: oxitetraciclina, benzil penicilina, estreptomina, neomicina, kanamicina, nistatina, trimetoprim, acetarsol y furoato de diloxanida, en todos los casos ninguno de ellos probó tener efectividad.

Por otra parte la polimixina B, la cloroquina, el metronidazol y siete sulfonamidas análogas solo tuvieron un efecto moderado. Se observó sin embargo un sinergismo entre las combinaciones de trimetoprim/sulfametoxazol y trimetoprim/polimixina B el mayor efecto inhibitorio se observó en la combinación con anfotericina B y paramomicina incluso en concentraciones tan bajas como 10 mcg/ml.

En otros ensayos se han sugerido como drogas altamente activas contra *Acanthamoeba* spp. a la polimixina E, la sulfadiazina, la polimixina B y trimetoprim/sulfametoxazol entre otros.

#### *Naegleria.*

En los primeros estudios que se hicieron para probar la eficacia de algunos fármacos en contra de especies de *Naegleria* spp. se aplicaron a ratones infectados con *Naegleria fowleri* dosis de sulfadiazina, emetina y anfotericina B. El resultado mostró que la mejor protección la daban la combinación de anfotericina B con sulfadiazina. Se ha demostrado que en el caso de *Naegleria fowleri* la anfotericina B ha resultado ser el mejor antibiótico amebicida con el que se cuenta en la actualidad en experimentos in vitro (Martínez, 1977).

La actividad de la anfotericina B incide directamente en el movimiento de las amebas y en la inhibición del crecimiento. Observaciones al microscopio demuestran que las amebas al entrar en contacto con este poderoso amebicida, pasan de una fase de completa actividad a una de completa inmovilización, esto se nota porque los pseudópodos normalmente encontrados en la fase de trofozoito se retraen y las amebas adquieren una forma redondeada. Posteriormente las vacuolas digestivas desaparecen y los orgánulos y demás estructuras celulares van desapareciendo

hasta que finalmente la masa celular pierde sus características y la ameba se destruye (Rondanelli, 1987).

El uso de la anfotericina B es altamente recomendado en la infección por *Naegleria* y esto se apoya más por el hecho de que se ha demostrado que es efectiva aún después de ser aplicada con un retardo de 48-72 hrs después de la infección. Un inconveniente al uso de la anfotericina B es su elevada toxicidad, sobre todo si se aplica en grandes dosis.

Por otra parte se está trabajando en un derivado de esta droga, un metil-éster cuya toxicidad es mucho menor que la de la anfotericina B. sin embargo, su potencial como amebicida es aún bajo.

Muchos antibióticos han sido probados en contra de las amebas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* (Thong, 1987), sin embargo, sólo algunos cuantos han mostrado cierta efectividad en pruebas de laboratorio, si bien es cierto que las amebas son sensibles a algunos de ellos, se debe recapacitar en el hecho de que un gran problema es la dificultad para emitir un diagnóstico oportuno de la enfermedad para aplicar el fármaco adecuado en contra de las amebas patógenas, tal es el caso de la EAG en el cual la mayoría de los diagnósticos han sido por autopsia. Es claro que se debe capacitar al médico que elabora un diagnóstico y al personal de laboratorio para que puedan detectar los casos de infección por amebas anfitriónicas.

Por todo lo anterior es necesario incrementar el estudio de la ecología, epidemiología y el diagnóstico oportuno de las meningitis provocadas por las amebas patógenas de vida libre para prevenir en lo posible, la infección, o en su caso, proporcionar a tiempo el tratamiento adecuado y evitar así, que el número de muertes ocasionadas por esta enfermedad se incremente.

#### **ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA:**

En el mundo se han reportado más de 130 casos de infecciones del tipo de la meningoencefalitis amebiana primaria, de manera general el curso de la infección está dado por una ameba patógena de vida libre *Naegleria fowleri*. Hasta la fecha no se ha reportado

ningun caso de la meningoencefalitis amebiana primaria que no haya sido producido por *N. fowleri*.

Sin embargo, otras naeglerias como *Naegleria lovaniensis* la cual no se considera patógena ha sido encontrada en líquido cefalorraquídeo LCR (Rivera et al., 1989). Asimismo, cepas del mismo género han demostrado ser altamente virulentas en ratones sin reportes de infecciones demostradas en humanos, este es el caso de *Naegleria australiensis italica* (De Jonckheere, 1984). Lo que se ha mencionado anteriormente involucra tan sólo los casos reportados en la literatura.

Si se considera que las características para que una ameba patógena se pueda desarrollar en el organismo humano no son difíciles de dar, podemos pensar que el problema es más grave de lo que se piensa, y que el número de muertes que ocurren debido a esta enfermedad puede ser mucho mayor.

Actualmente el problema de las infecciones por amebas de vida libre es que su detección es extremadamente difícil (Culbertson, 1975), y sobre todo que el diagnóstico médico se hace casi siempre por investigadores, es decir, el médico general no está entrenado aún para diferenciar una meningoencefalitis viral o bacteriana de una infección por amebas, debido a que ésta, se considera como "rara" y que no existe información que sea accesible al médico y al laboratorista.

El obstáculo principal se centra en la dificultad que existe para la identificación de las amebas ya sea por observación directa de los fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo (LCR) que es el lugar donde se puede encontrar a las amebas para su diagnóstico, o bien a partir de cultivos en medios de agar especiales. Para una persona no adiestrada las amebas pueden pasar desapercibidas como simples artefactos o partículas de sedimento del mismo fluido o medio de cultivo.

Más aún, una vez aisladas las amebas, la identificación morfológica es muy difícil ya que las diferentes formas de amebas de vida libre sólo se diferencian entre sí a nivel de género por estructuras o características incipientes que un buen protozoólogo va reconociendo para hacer la diagnosis del organismo.

Para ayudar en el diagnóstico de las amebas de vida libre se han desarrollado técnicas enzimáticas e inmunológicas que permiten un diagnóstico más seguro de los organismos, una vez que se ha detectado un caso de MEAP.

En México se han detectado 3 casos comprobados de MEAP. El primero de ellos se reportó en Mexicali B.C. (Valenzuela, *et al.*, 1984), en un adolescente varón de 16 años. La historia clínica señaló que su ingreso al hospital fue debido a un intenso dolor de cabeza, y que siete días antes el paciente había nadado en un canal de riego de poca profundidad. Las altas temperaturas que se alcanzan en el verano en Baja California, hacen que el nadar en cuerpos de agua de casi cualquier tipo sean una práctica muy frecuente en la zona. El paciente murió tres días después de haber sido hospitalizado.

La observación del líquido cefalorraquídeo mostró formas amebianas en movimiento activo. El análisis post-mortem reveló una meningoencefalitis con hemorragia severa y amplia destrucción de la fosa posterior del cerebro. La tinción con inmunoperoxidasa para las amebas aisladas del tejido cerebral, fue positiva para *Naegleria fowleri*.

El segundo caso de MEAP por *Naegleria fowleri* fue identificado en Monterrey N.L. (Rodríguez, 1984). El diagnóstico en este caso se hizo a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo y la observación directa de las muestras así como las preparaciones con la técnica de coloración de Gomori revelaron que el proceso infeccioso fue provocado por *N. fowleri*. Un hecho notable en este caso fue que el paciente sobrevivió después de un tratamiento a base de anfotericina.

Finalmente, el tercer caso de MEAP descrito en México en la zona de Huetamo, en Michoacán (López-Corella, *et al.*, 1989) reporta la muerte de un joven de 13 años por meningoencefalitis con necrosis parenquimatosa con destrucción del cerebelo. Las muestras tomadas de las lesiones del tejido nervioso mostraron numerosos trofozoítos de amebas, posteriormente identificados por inmunohistoquímica como *Naegleria fowleri*.

En este caso, quedó sin precisar el origen de la infección pero se presume que pudo haberse debido a que el paciente haya nadado en alguna zona contaminada, ya que es bien conocida la forma de contagio de *N. fowleri* (De Jonckheere, 1978), además de que las condiciones para que puedan encontrarse amebas de vida libre patógenas, aunque sólo sea de forma transitoria, son las adecuadas en esta zona de México.

En México existen las condiciones ideales para el desarrollo de amebas patógenas de vida libre. El clima y la abundancia de cuerpos de agua con características adecuadas para el desarrollo de amebas patógenas, son comunes en todo el territorio nacional.

Por otra parte, el reporte de tan sólo 3 casos de MEAP ratifica, como ya se ha mencionado anteriormente, que algunos otros casos de infección amebiana pueden haber sido confundidos con infecciones bacterianas o virales.

#### **IMPORTANCIA DEL GENERO *Hartmannella* EN EL PRESENTE ESTUDIO**

En la literatura no se ha reportado a *Hartmannella* como un organismo causante de meningoencefalitis, aunque esta ameba pertenece al grupo de las gimnamebas, donde, como ya se ha mencionado, se ubican las especies patógenas *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

Las amebas del género *Hartmannella* han sido encontradas con cierta frecuencia a partir de muestras de agua dulce y de suelo (Kasprzak, 1982) en diferentes partes del mundo. Sin embargo, Cervá en 1973, registró la presencia de estas amebas en la mucosa nasal de seres humanos. En ensayos de patogenicidad se han probado hartmanelas de varias especies y de diferentes hábitats pero en todas ellas la prueba ha resultado negativa.

Actualmente el género *Hartmannella* se ha formado como un grupo más natural y se ha puesto especial cuidado en separar a las especies que anteriormente fueron colocadas ahí por los primeros microscopistas (Singh, 1979).

Page (1988), ha descrito con gran precisión la posición taxonómica de *Hartmannella* y ha descartado y reclasificado a

otros organismos que habían sido colocados en este género en años anteriores.

De esta manera el género *Hartmannella* se ubica en la Clase Lobosea y deriva en la Familia Hartmannellidae. Características ultraestructurales finas, han permitido identificar aspectos distintivos únicos en esta Familia como la presencia de estructuras muy delicadas en forma de copa sobre la superficie de la membrana, formando un delgado glicocáliz. Estas estructuras no son encontradas en organismos de los grupos Heterolobosea ni Lep-tomyxidae con los cuales existe una íntima relación.

A la fecha Page ha reportado cinco especies del género *Hartmannella*.

*Hartmannella cantabrigiensis*

*H. vermiformis*

*H. hyalina*

*H. agricola* y

*H. crumpae*

*Hartmannella* es una ameba de tamaño variable, su diámetro en condiciones de estabilidad y forma redondeada es de aproximadamente 10 a 18  $\mu\text{m}$ . Durante la locomoción la forma más aparente es la de limax y se lleva a cabo sin mostrar una notable erupción de su cuerpo. Existe un bien definido ectoplasma y un endoplasma. De manera general se presenta un núcleo, pero se pueden encontrar especies binucleadas.

Las mitocondrias estudiadas por microscopía electrónica son la mayoría de las veces alargadas y sirven para establecer un criterio de identificación. *Hartmannella* no produce un estado ameboflagelado en ninguna de sus fases.

Los quistes son de tamaño muy variado y presentan una pared doble. En diferentes fases de maduración del quiste la pared se engrosa mucho. En esta fase de la ameba no hay división nuclear.

Las amebas del género *Hartmannella* llevan a cabo la división mitótica, desapareciendo gradualmente el nucléolo central durante la profase. En la metafase desaparece la membrana nuclear. la consideración de este tipo de división es importante,

ya que el esquema de clasificación para las amebas de vida libre toma en cuenta el tipo de reproducción que estos organismos efectúan.

Históricamente el género *Hartmannella* había sido utilizado para colocar a aquellas amebas con filópodos y quistes estrellados que no podían ser reconocidas como acantamebas típicas, incluso en ocasiones *Hartmannella* y *Acanthamoeba* eran sinónimos (Ensminger, 1966).

Ahora, el desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica, biología molecular, isoelectroenfoque enzimático e inmunología avanzada, aplicados al estudio de los protozoos han permitido establecer un criterio más exigente y por lo tanto más preciso de clasificación. Esto involucra cambios, como la propuesta de nuevos grupos y la desaparición de otros.

En este trabajo se describe por primera vez a una ameba de vida libre del género *Hartmannella*, que provocó la evolución de un cuadro de meningoencefalitis en un paciente, asimismo se describen los aspectos ultraestructurales de importancia taxonómica que nos han llevado a colocar a la cepa aislada dentro del grupo de las hartmannellas.

#### REPORTE CLINICO DEL CASO

Se presenta un caso de un paciente masculino de 18 años de edad con una infección atípica en donde se combinan los síntomas descritos para infecciones causadas por *Naegleria fowleri* o por *Acanthamoeba* spp. Se hace especial referencia a este hallazgo puesto que no se había descrito hasta ahora ninguna infección por amebas de vida libre patógenas que originara un cuadro patológico con síntomas característicos a los presentados por el paciente.

Los síntomas del paciente al ingresar al Hospital Universitario de Puebla fueron: cefalalgia, rinorrea, rinofaringitis, náusea, vómito, odinofagia, hipotermia, hipertensión arterial y desnutrición grado I.

En el hospital se presentaron otros síntomas como: estupor, alteración de la conciencia, diplopia, pérdida del control de

esfínteres, bradicardia, taquipnea, ptosis parpebral, papiledema, hipotonía muscular, arreflexias y rigidez del cuello entre otros, progresando eventualmente hasta el estado de coma.

Al analizar los antecedentes de la meningoencefalitis desarrollada por el paciente, se encontró que éste había tenido contacto directo con el agua contaminada al sumergir la cabeza en una pileta que había en su lugar de trabajo, dicha pileta servía para remojar piedras de alabastro antes de ser cortadas. Como es de suponerse, el aporte de contaminantes, incluyendo a las amebas del suelo, debió ser considerable.

El paciente fue tratado en el Hospital Universitario de Puebla. Al principio el diagnóstico fue referido como una meningitis bacteriana, de tal manera que fue tratado con fuertes dosis de antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, gentamicina y estreptomina. Este tratamiento fue apoyado por una prolongada terapia inmunosupresiva. Todo ello nos hace suponer que la dispersión del parásito se pudo haber favorecido durante la terapia, ya que ninguno de los antibióticos mencionados anteriormente ha sido reportado eficaz en contra de amebas de vida libre.

Aproximadamente 10 días después de que el paciente fue internado en el Hospital, se le tomó una muestra de líquido cefalorraquídeo que fue canalizada al laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la ENEP Iztacala UNAM, ahí se aisló una ameba de vida libre perteneciente al grupo de las gimnamebas, dentro del cual se incluyen las especies patógenas, a este organismo aislado se le asignó la clave PT-1 (Puebla-Tehuacán caso 1).

El hallazgo se reportó al hospital y se sugirió además un tratamiento con anfotericina B, medicamento que ha probado ser efectivo en muchos casos de infecciones por este tipo de amebas.

La anfotericina B no fue administrada en ninguna fase del tratamiento, y se siguieron administrando medicamentos indicados en infecciones bacterianas especialmente para tuberculosis. El paciente fue retirado del hospital por sus familiares con un deterioro progresivo y la pérdida total del tratamiento con

el que se le había mantenido. El paciente fue llevado a su casa en estado de coma con problemas respiratorios graves y se reportó su muerte 10 semanas después del inicio de su enfermedad.

No se pudo efectuar el examen post-mortem para determinar con precisión la causa de la enfermedad debido a la negativa de los familiares para permitir hacerla.

En este trabajo se reporta la presencia de un organismo amebiano del género *Hartmannella vermiformis* hallado en el LCR del paciente como el posible agente causal de la infección atípica de meningoencefalitis.

---

## **OBJETIVOS**

---

**Caracterizar por morfología y fisiología una ameba de vida libre causante de la muerte de un adolescente por meningoencefalitis.**

**Establecer la situación taxonómica de la ameba aislada de un paciente que presentó un caso de meningoencefalitis de etiología desconocida.**

---

## MATERIAL Y METODOS

---

Muestras de líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningoencefalitis de etiología desconocida fueron llevadas al Laboratorio del Proyecto CyMA de la Unidad de Investigación de la ENEP Iztacala UNAM, y se procesaron según el esquema propuesto por De Jonckheere (1984), figura 2.

Los análisis de laboratorio hechos en el Hospital Universitario de Puebla para la búsqueda de bacterias como el origen de la enfermedad fueron negativos.

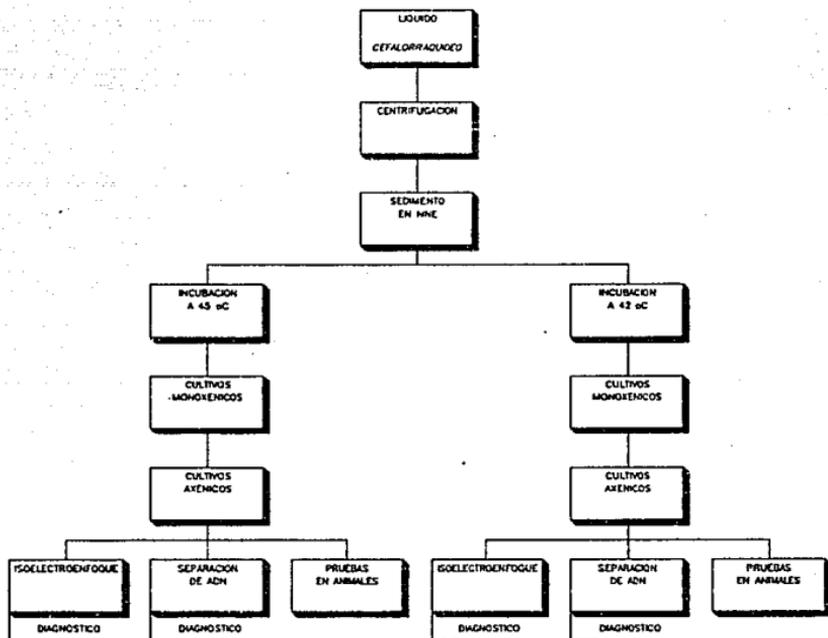
Se pensó en la posibilidad de una ameba patógena del género *Naegleria* como el agente causante de la enfermedad por los reportes anteriormente registrados de este organismo como agente causal de meningoencefalitis (Rivera, 1987; Martínez, 1985).

En los tres días siguientes se tomaron muestras de 5 ml de LCR. Las muestras fueron centrifugadas a 2 500 rpm durante 10 minutos, y el sedimento se sembró en cajas con agar no nutritivo y *Escherichia coli* muerta a 75 °C por una hora en baño de agua (medio NNE). Estos cultivos fueron incubados a 30 °C y revisados diariamente en un microscopio invertido.

### CULTIVO Y AISLAMIENTO

De esos cultivos se seleccionaron y cortaron aquellas zonas de buen crecimiento amebiano y se transfirieron a nuevas cajas de NNE. Los subcultivos de las muestras se hicieron semanalmente.

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE AMEBAS DE VIDA LIBRE



*Metodología utilizada para aislar  
e identificar a la cepa PT-1*

Fig.2

La manipulación del material biológico desde su obtención hasta su procesamiento final se hizo en ambiente estéril. Las muestras se trabajaron en campanas de flujo laminar.

### AXENIZACION

En muchas pruebas de laboratorio sobre todo en aquellos procesos bioquímicos, de biología molecular así como en pruebas de patogenicidad, es deseable que las amebas se encuentren en cultivos puros. Aunque inicialmente por requerimientos de la metodología de aislamiento las amebas de vida libre aparecen asociadas a un tipo de bacteria, en este caso *E. coli*. Por ello se hacen continuas transferencias de estas amebas en diferentes medios axénicos que cumplan con los requerimientos mínimos para el desarrollo de estos organismos.

Los medios axénicos contienen sales y alguna fuente de carbono y aminoácidos como glucosa y suero fetal de bovino. En ocasiones es necesario agregar a estos medios sustancias como vitaminas e incluso ácidos nucleicos para favorecer el crecimiento de estas amebas. Por otra parte, con el fin de evitar contaminación bacteriana en este tipo de cultivos axénicos, se agregan antibióticos, seleccionando aquellos que no tengan efecto tóxico para las amebas de vida libre, comúnmente penicilina G sal sódica, estreptomycinina y kanamicina en concentraciones de 200 mcg/ml.

Para la cepa PT-1 se utilizaron los siguientes medios:

Medio PBSGM (Chang modificado)

Medio 354 para *Acanthamoeba*

Medio 710 de Nelson para *Naegleria*

Medio 711 PYB

Medio 902 de Schuster para *Naegleria*

Medio 997 para amebas de agua dulce

Medio 1029 LIT

Medio 1152 EG

Medio PYNFH (modificado)

Medio CDC:V-009 para *Hartmannella* (com. pers. Visvesvara)

La cepa amebiana PT-1 fue incapaz de crecer en los medios axénicos mencionados anteriormente, lo que demuestra que tiene una alta especificidad de requerimientos para su

alimentación y desarrollo. Se ha reportado su crecimiento axénico sólo en los medios con ácido desoxirribonucleico (ADN) correspondientes a los medios de cultivo PYNFH y CDC:V-009.

Los medios de cultivo axénicos estuvieron disponibles al final de esta tesis por lo que la mayoría de las pruebas se efectuaron con medios monoxénicos.

Para evitar en lo posible las interferencias con la bacteria *E. coli* muerta, se hicieron lavados constantes en centrífuga a baja velocidad por periodos cortos de tiempo 1 000 rpm durante 5 minutos y siempre se corrieron testigos con la bacteria *E. coli* para suprimir dichas interferencias.

#### **- Prueba de tolerancia a la temperatura**

Cada duplicado de las placas de NNE inoculadas con la muestra de agua se incubó por separado a temperaturas de 42 y 45 °C durante 48 horas. Este criterio de aislamiento se debe a que las diferentes especies de amebas se desarrollan en ámbitos de temperatura diferentes, y se ha observado que las amebas patógenas crecen, por lo general, a temperaturas de incubación altas, mientras que otras especies de vida libre lo hacen a temperaturas inferiores.

Todas las cepas patógenas son termófilas pero no todas las termófilas son patógenas (Martínez, 1985). Se requirió de observación diaria para verificar si había crecimiento amebiano.

La prueba de temperatura para el aislamiento de las amebas posiblemente patógenas se hace a 42 y a 45 °C, sin embargo se probó la capacidad de resistencia de la cepa PT-1 a temperaturas mayores aumentando 1 °C cada 24 horas después de haber obtenido trofozoítos a la temperatura anterior hasta alcanzar los 48 °C que fue el límite en el cual la ameba dejó de crecer.

#### **IDENTIFICACION**

##### **- Transformación ameboflagelar**

Esta prueba consiste en colocar unas gotas de agua destilada sobre la superficie de una caja de NNE inoculada con la ameba,

que se incubaba a 37 °C durante 2 horas. Se hace una observación constante con el microscopio invertido cada 1/2 hora para observar la presencia de formas flageladas. Esta prueba sirvió para descartar la posibilidad de que la cepa PT-1 perteneciera a los géneros flagelados de la Familia Vahlkampfiidae incluyendo a *Naegleria* (Rivera et. al. 1978; De Jonckheere, 1981).

#### - Microscopía de luz

La observación de la cepa PT-1 ha sido con el microscopio de contraste de fases (Zeiss Mod. III). Las observaciones se hicieron a partir de cultivos amebianos en sus formas trófica y quística en diferentes fases de maduración. Las muestras fueron tomadas a partir de cultivos hechos en placas de agar NNE por barrido con solución salina de Page o con solución Ringer para evitar choque osmótico.

#### - Morfometría

Las muestras fueron observadas directamente a 40X. Se tomaron las medidas de 100 trofozoitos (longitud, anchura y diámetro de núcleo) y 100 quistes (diámetro) reportando el promedio. Se registraron las diferentes formas adoptadas por el trofozoito y se hizo una búsqueda intensiva en los quistes de poros los cuales son importantes para la determinación de la especie.

#### - Tinciones

Para observar la cepa PT-1 a 100X en inmersión, se hicieron preparaciones permanentes teñidas con los siguientes colorantes:

Tinción Tricrómica (modificada por Červa)

Tinción Giemsa

Tinción de Hematoxilina de Harris

Se hizo el registro fotográfico de estas preparaciones en el fotomicroscopio a 800 y 1 000 X en contraste de fases.

De la manera anterior se compararon las cepas de referencia de *Hartmannella vermiformis* 1534/7A, 1534/7B y 1534/12 pertenecientes al catálogo de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) de Gran Bretaña con la cepa PT-1.

### **- Ultraestructura de la cepa PT-1**

El procedimiento de microscopía electrónica de transmisión es una herramienta muy importante en la descripción de la cepa PT-1 puesto que hasta ahora sólo existen pequeñas estructuras celulares típicas de la Familia Hartmannellidae con las cuales hemos relacionado a esta especie de ameba aislada de un paciente.

La búsqueda de finas microvellosidades parecidas a copas o ventosas a lo largo de la superficie celular solamente aparentes con el uso del microscopio electrónico ayudan a determinar la especie amebiana.

A partir de cultivos ricos en trofozoítos y cultivos ricos en quistes, se hicieron concentrados en solución Ringer por centrifugación a 2 500 rpm durante 15 min. Se desecha el sobrenadante y se recupera el concentrado final en 0.5 ml de "buffer" de cacodilato y glutaraldehído al 4 % pH 7.1.

Los concentrados obtenidos de esta manera se procesan por el método básico para microscopía electrónica de transmisión. Se eligen los mejores ejemplares y se obtienen fotografías en blanco y negro 8 X 10 pulgadas en papel.

### **- Isoelectroenfoque**

Esta prueba bioquímica permite apoyar el diagnóstico que se hace actualmente de las amebas aisladas. Se utiliza para verificar el diagnóstico morfológico de la cepa amebiana aislada y de esta manera integrar un criterio metodológico para el establecimiento del diagnóstico de clasificación preciso.

La prueba de isoelectroenfoque (IEF) es una herramienta para la identificación de amebas, que se basa en la comparación de patrones enzimáticos de cepas problema con cepas de referencia tipo.

El isoelectroenfoque consiste en separar los diferentes componentes de una enzima sobre un sustrato de agarosa con un anfolito. Al hacer pasar una corriente eléctrica de alto voltaje

sobre este sustrato y una muestra de amebas, por las propiedades del anfolito, se genera un gradiente de pH sobre la agarosa y las enzimas de las amebas migran en este pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico.

Con un revelador enzimático adecuado se pueden hacer visibles las bandas de las enzimas que responden a un sustrato específico haciendo visibles aquellas enzimas que nos sean útiles para la identificación amebiana.

De esta manera las enzimas de cada organismo pueden ser analogadas con una huella digital. Si una ameba muestra un patrón enzimático semejante a otra ameba, existe una gran probabilidad de que ambos organismos pertenezcan a la misma especie.

Se hicieron pruebas para las siguientes enzimas según el procedimiento descrito por De Jonckheere (1982):

Fosfatasa ácida (FA)  
Propionil esterasa (PE)  
Alcohol deshidrogenasa (AlcDH)

Además se compararon los patrones de Proteínas Totales (ProT) de la ameba PT-1 con aquellas de las amebas tipo.

Las hartmanellas de referencia utilizadas fueron:

*Hartmannella vermiformis* 1534/7A  
*Hartmannella vermiformis* 1534/7B  
*Hartmannella vermiformis* 1534/12

Todo ello con el equipo de isoelectroforesis de Pharmacia con que cuenta el laboratorio de amebas del Proyecto CyMA.

#### **- Pruebas de patogenicidad**

La prueba de patogenicidad en ratones ha servido para probar si una cepa amebiana es capaz de provocar infección en animales de laboratorio, con el fin de hacer inferencias de su posible patogenicidad en los seres humanos.

**La patogenicidad de las amebas se probó en dos fases: Por inoculación intracerebral y por inoculación nasal.**

**La inoculación intracerebral se hizo concentrando amebas en cultivo en máxima tasa de crecimiento por centrifugación a 2 500 rpm durante 10 min a partir de un subcultivo de amebas de 7 días, se alcanzó una concentración de amebas de aproximadamente 1 000 000 por ml.**

El sedimento se toma con una jeringa para insulina y se inocula un lote de 5 ratones de 2 a 6 semanas de edad por cada cepa de ameba. A cada ratón se le inocula un volumen de 0.02 ml del concentrado de amebas asegurándose de introducir no menos de 10 000 especímenes. La aplicación es intracerebral a través de los huesos parietales o de la articulación interparietal, hacia la línea media del cráneo o a la altura de las orejas.

Por otra parte, y con el mismo procedimiento para la concentración de amebas, para la misma cepa, con una jeringa de 1 ml se ponen 2 gotas (0.02 ml) de la suspensión de amebas en los orificios nasales de otro lote de 5 ratones. Este procedimiento es por inoculación nasal.

Los ratones inoculados de las dos maneras se vigilaron diariamente para observar cambios en el comportamiento y sobre todo el período y el número en que mueren si la cepa es patógena. Los ratones que murieron antes de 21 días fueron abiertos quirúrgicamente extrayendo cerebro, hígado, pulmón y riñones, se sembraron en cajas de NNE y se incubaron a 30 °C para buscar amebas. Si los ratones no mueren antes de los 21 días, se sacrifican y también se les extraen los órganos y se siembran de la misma manera.

#### **- Histología de órganos inoculados con la cepa PT-1**

Para evidenciar el daño producido por la cepa amebiana PT-1 en diferentes órganos de un organismo, así como para rastrear el mecanismo de dispersión de la ameba, se hizo el seguimiento histopatológico del proceso de infección causado por la ameba. Para ello se inocularon por vía intranasal e intracerebral con ameba PT- 1 lotes de ratones de 3 semanas de edad.

Dada la virulencia de la cepa, los ratones murieron a los pocos días de ser inoculados. Enseguida, se recuperaron de los diferentes órganos como riñón, pulmón, hígado y cerebro. Con el fin de verificar que el patógeno fue el causante de la muerte de los ratones, parte de dichos órganos fueron inoculados en placas de agar NNE para recuperar las amebas y comprobar que la muerte se debió a estos organismos.

La otra parte del órgano fue fijada con formaldehído tamponado al 10 % y procesada para obtener cortes semifinos para observación al microscopio óptico en contraste de fases.

#### - Tinciones de tejidos

Se utilizaron los siguientes procesos de tinción:

Tinción de Hematoxilina-eosina  
Tinción Tricrómica de Gomori (modificada por Červa)  
Tinción de Lillie para ácidos nucleicos  
Tinción de Giemsa  
Tinción de Pas  
Tinción de azul de toluidina

Se hicieron cortes finos de los diferentes órganos para observación al microscopio electrónico de transferencia (Zeiss M-10) con la finalidad de demostrar la inclusión de las amebas en los tejidos y determinar el daño histológico producido.

#### -División celular- (en microcultivos)

La técnica de microcultivos en cámaras de Pussard ha servido como un criterio para ubicar taxonómicamente a las diferentes familias de amebas de acuerdo al tipo de división celular que llevan a cabo. De esta manera se busca evidenciar las promitosis así como las metamitosis típicas características de los diferentes géneros amebianos.

Las cámaras de Pussard son portaobjetos simulando pequeños ecosistemas cerrados constituidos por un sustrato de agar, una cierta concentración de amebas y grandes cantidades de bacteria viva *E. coli* como alimento (Pussard, 1973).

En estos sistemas, las amebas crecen del centro del sistema hacia los extremos creándose en ese mismo sentido diferentes situaciones de estrés. De esta manera en un pequeño sistema podemos tener diferentes etapas de desarrollo amebiano capaces de ser monitoreadas para seguir todo el proceso de desarrollo incluyendo la observación de la división nuclear de una o de un grupo de amebas seleccionado.

Se hizo el registro fotográfico y la descripción del proceso de división nuclear en estas cámaras de microcultivo de Pussard.

#### - SENSIBILIDAD A FARMACOS

Debido a que la cepa PT-1 ha resultado patógena se incluye en esta tesis una prueba de sensibilidad a fármacos que han probado ser efectivos con otras amebas. La metodología para estas pruebas de fármacos "in vitro" y la elección de los medicamentos se basó en los reportes de la aplicación de dichos fármacos en pacientes con infecciones por amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* (Ferrante, 1984).

En placas para pruebas de ELISA se depositó una suspensión de amebas de la cepa PT-1 a una concentración de  $1 \times 10^4$  células y se aplicaron los antibióticos a las concentraciones abajo señaladas. Los antibióticos probados fueron:

Clorhidrato de tetraciclina 25, 50, 100, 250 y 500 mcg/ml.  
Trimetoprim/Sulfametoxazol 8, 25, 50, 100 y 250 mcg/ml  
Tobramicina 4, 8, 25, 50 y 100 mcg/ml  
Ketoconazol 4, 8, 25, 50 y 100 mcg/ml  
Itraconazol 4, 8, 25, 50 y 100 mcg/ml

Cada ensayo se realizó por triplicado en trofozoítos y quistes de la cepa PT-1 y *Hartmannella vermiformis* de referencia 1534/7A, se corrió un testigo sin antibiótico en cada prueba. Las placas fueron incubadas a 30 °C.

Se hicieron observaciones a 400·X en un invertoscopio, al momento de la inoculación del medicamento y 24 horas después, para observar los efectos en las amebas. A las 24 horas se hizo un lavado de las placas con agua destilada para eliminar el medicamento y se agregó 0.05 ml de una suspensión de bacteria

**viva *E. coli* como alimento, 24 horas después se hacen nuevas observaciones para estimar el efecto de los medicamentos sobre las amebas probadas.**

---

## RESULTADOS

---

En el Hospital Universitario de Puebla (HUP) se presentó el caso de un paciente con cefalea severa, rinoфарингитis, fiebre, náusea, vómito e hipertensión. Los antecedentes de importancia en este caso fueron el diagnóstico de desnutrición en grado I y el hábito del paciente de sumergir la cabeza en un estanque de agua contaminada para refrescarse.

El primer diagnóstico del Hospital Universitario fue de meningocefalitis bacteriana, y por ello el tratamiento incluyó antipiréticos, antihistamínicos, y fuertes dosis de antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, penicilina, gentamicina y estreptomycin. En este tiempo el paciente no mostró mejoría y su situación empeoró.

Sin embargo, el diagnóstico nunca fue comprobado ya que todos los análisis de laboratorio en búsqueda de virus y bacterias fueron negativos. Se tomaron muestras de sangre para la prueba del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) siendo también negativas.

Por punción lumbar se tomó líquido cefalorraquídeo (LCR) que mostró presión aumentada, turbiedad, incremento del nivel proteico, nivel de glucosa disminuido, células muy abundantes y el examen bacteriano en LCR fue negativo (tabla 1).

Diez días después de su ingreso al Hospital Universitario de Puebla, se reportó el caso al Laboratorio del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) UIICSE ENEPI UNAM.

Tabla 1

Resultados del análisis de Líquido Ceforraquídeo (LCR) y otros estudios llevados a cabo en el paciente.

*Prueba de SIDA:* Negativa

*Tomografía Axial Computarizada:* Aracnoiditis Basal

*Rayos X:* Señales de patología respiratoria

Citoquímica del LCR

	No. de días después de la admisión					
	2	4	8	16	18	19
No. de células	137	500	15	13	-	-
Linfocitos	39%	45%	50%	100%	-	-
Neutrófilos	70%	52%	50%	-	-	-
Monocitos	1%	-	-	-	-	-
Proteínas (mg/100 ml)	272.4	152.8	243	-	-	-
Globulinas	+	+	trazas	trazas	-	-
Glucosa (mg/100 ml)	10.3	10	53.3	29.3	-	-
Aspecto	turbio	turbio	crystalino	turbio	turbio	turbio
Aislamiento bacteriano	—————			Negativo		—————
Aislamiento amebiano	—— No llevado a cabo ——			+	+	+

+ *positivo*

- *negativo*

Se enviaron 3 muestras de LCR al laboratorio CyMA para la búsqueda de amebas de vida libre, las tres muestras resultaron positivas a la presencia de amebas. En las tres muestras se encontró siempre el mismo organismo.

Las primeras observaciones del LCR mostraron la presencia de un organismo polimórfico dependiendo de las condiciones de cultivo. Al principio se pensó por la sintomatología del paciente que el organismo aislado pertenecía a la especie *Naegleria fowleri*.

La ameba creció en medio de agar no nutritivo con *Escherichia coli* muerta (NNE).

#### - Axenización

La cepa PT-1 creció muy bien en presencia de la bacteria *E. coli*, Sin embargo, para evitar interferencias en las pruebas bioquímicas y de patogenicidad a las que se sometió a la ameba se probaron diferentes medios de cultivo axénicos para aislar en cultivo puro a la cepa amebiana PT-1. El medio PYNF recomendado por la American Type Culture Collection (ATCC) para *Hartmannella* y modificado por Visvesvara fue el único medio de cultivo axénico donde creció sin restricciones la cepa PT-1.

#### - Prueba de tolerancia a la temperatura

Se probó la capacidad de la ameba para crecer en diferentes condiciones de temperatura (sabemos que las especies patógenas de amebas crecen mejor a temperaturas altas), y la cepa PT-1 creció hasta la temperatura de 47 °C, a los 48 °C comenzó un rápido proceso de enquistamiento y los cultivos a las 24 horas sólo presentaron quistes, los cuales fueron viables al ser sembrados en medio NNE fresco a temperaturas de 42 °C. La temperatura óptima de crecimiento fue de 37 °C.

#### IDENTIFICACION

#### - Transformación amebo-flagelar

No se encontraron fases temporales de flagelación. En repetidas pruebas para inducir la flagelación la cepa PT-1 fue incapaz de

exhibir esta característica, este fue un criterio más para descartarla como una posible *Naegleria*.

#### **- Morfología**

Por microscopía de luz las amebas aisladas mostraron dos diferentes formas tróficas incluyendo las formas aplanada (Fig. 3), limax (Fig. 4), y una quística (Fig. 6) con diversas etapas de maduración.

#### **- Tinciones**

Trofozoítos y quistes de la cepa PT-1 fueron fijados en placas permanentes y teñidos con diferentes colorantes con el fin de encontrar características distintivas que nos ayudaron en la identificación de la ameba.

Con la tinción tricrómica de Gomori (modificada por Červa) se obtuvieron preparaciones donde se contrastó perfectamente el núcleo de un denso color azul y los demás orgánulos en tonalidades de púrpura. Además este tipo de fijación y tinción garantizó que los organismos así preparados conservaran su forma y tamaño exactos, permitiendo mantener un registro de imágenes muy preciso de esta cepa.

Las tinciones con colorantes de Giemsa y con hematoxilina de Harris permitieron definir las diferentes formas del trofozoíto y del quiste; sin embargo, no aportaron ninguna información adicional que facilitara la identificación de la cepa PT-1.

#### **- Trofozoíto**

La ameba es uninucleada, y adopta la forma "limax" verdadera (en cámaras de Pussard) a la búsqueda de alimento y en esta fase se observa aunque no muy aparente un extremo uroíde. Al avanzar, el pseudópodo de avance presenta dos estructuras hialinas en forma de pseudópodos más pequeños (Fig. 3).

El cambio de la forma limax a la forma aplanada se da cuando las condiciones son favorables para su alimentación, si hay exceso de alimento la ameba adopta una forma multivacuolada (Fig. 5).

#### **- Locomoción**

La actividad locomotora de la cepa PT-1 no es muy típica como ya lo hemos mencionado anteriormente. Los pseudópodos son gruesos y eruptivos en forma de lobópodos, en ningún momento aparecen estructuras como filópodos.

En agar NNE la cepa PT-1 se desplaza formando un pseudópodo frontal grueso que parte de la región anterior de la ameba, éste apéndice se va adelgazando hacia el frente para mantener la forma limax, de manera que al avanzar el segmento posterior se mantiene más estrecho que el resto de la célula. El cambio de dirección ocurre por la formación de otro pseudópodo más o menos lateral en la región frontal.

En cámaras de Pussard el movimiento de desplazamiento es relativamente rápido.

#### **- Quiste**

Los quistes observados presentan dos formas relativamente diferentes, redondos y ovoides (en cámaras de Pussard). Las diferentes formas de esta etapa se deben a las fases de maduración del proceso de enquistamiento. De esta manera se denomina prequiste a la fase más temprana de formación, en este periodo pueden observarse con claridad las características del trofozoito como las vacuolas y el núcleo.

El quiste maduro muestra una forma bien redondeada y una densa capa mucilaginosa externa.

El estado quístico no muestra poros, lo que se confirmó posteriormente por microscopía electrónica. El quiste presenta un núcleo bordeado por cromatina (Fig. 6).

#### **- Morfometría**

La medida de los trofozoitos y quistes de la cepa PT-1 en un promedio de 50 organismos se muestran en la tabla 2.

### Forma limax

longitud 16.45  $\mu\text{m}$  intervalo 14.1 a 18.8  $\mu\text{m}$   
anchura 5.66  $\mu\text{m}$  intervalo 4.7 a 7.05  $\mu\text{m}$

Núcleo 4.08  $\mu\text{m}$  intervalo 3.9 a 4.4  $\mu\text{m}$   
Nucléolo 2.14  $\mu\text{m}$  intervalo 1.98 a 2.4  $\mu\text{m}$   
Quiste 10.22  $\mu\text{m}$  intervalo 7.71 a 12.85  $\mu\text{m}$

Tabla 2. Se muestra el promedio de medidas de la cepa PT-1 de 100 quistes y 100 trofozoitos.

Las medidas de la cepa PT-1 fueron tomadas de la fase limax, la más común, y a partir de medio de cultivo (NNE), dado que el polimorfismo de esta ameba es muy grande.

#### - Núcleo

Todas las amebas son uninucleadas con un núcleo grande y bien definido. En estado de reposo la cromatina se encuentra localizada alrededor de un nucleólo muy prominente. Esto debe ser reportado en la descripción de la especie.

La división celular en la cepa PT-1 se desarrolla con el mismo patrón de división de los metazoos. Es decir, que estas amebas se multiplican por una metamitosis central, este proceso difiere de manera absoluta con el mecanismo de división permitótica encontrado en *Naegleria*.

En microcultivos en cámaras de Pussard, se vio a la cepa PT-1 en diferentes fases de desarrollo incluyendo la fase de división. En este proceso se observó una mitosis de tipo abierta donde la membrana nuclear se desintegra en la etapa de metafase, continuando con el proceso de división normal y que se define como fisión binaria asociada a una metamitosis.

#### ULTRAESTRUCTURA

Por microscopía electrónica se evidenciaron aspectos de estructuras celulares útiles como criterio morfológico para la

clasificación de la cepa PT-1 tales como mitocondrias, núcleo, membrana celular y cubierta del quiste.

Por este método de observación se descartó también la presencia de bacterias endocíticas en la ameba PT-1.

#### - Mitocondrias

Las mitocondrias presentaron frecuentemente formas elípticas u ovals y de manera general alargadas. La presencia de formas ovaladas en algunas figuras puede deberse al seccionamiento oblicuo del paquete celular. Las crestas mitocondriales encontradas en los trofozoítos son de forma tubular (Fig. 7).

#### - Aparato de Golgi

En el caso de *Hartmannella vermiformis* descrita por Page (1988), se reporta la presencia del aparato de Golgi más o menos prominente cerca del núcleo, sin embargo al buscar esta microestructura en las micrografías electrónicas de la cepa PT-1 no se encontró aparato de Golgi, en diferentes secciones y ángulos de corte del paquete celular.

#### - Núcleo

Por microscopía electrónica de transferencia se comprobó lo observado por microscopía de luz en cuanto a la morfología observada. Además se hizo evidente la presencia de cuerpos conspicuos de cromatina extranucleolar entre la membrana nuclear y el nucleolo. Concentrándose gran parte de esta cromatina condensada sobre la pared del núcleo. Esta propiedad fue observada solamente en secciones de quistes (Fig. 8).

#### - Membrana celular

En toda la superficie del trofozoíto se observó una fina capa de microvellosidades las cuales a grandes aumentos (más de 6 000 X), dejan ver formas parecidas a copas o ventosas (Fig. 7), y que son únicas del género *Hartmannella*.

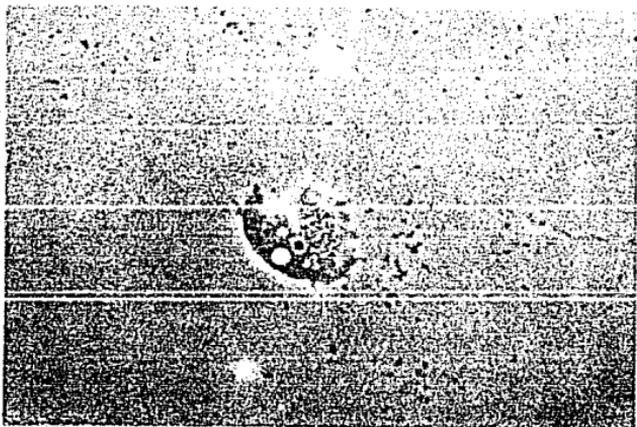


Fig. 3. Trofozoito de la cepa PT-1 aislada (*Hartmannella*) mostrando la forma aplanada, (en contraste de fases 1 260 x).



Fig. 4. Grupo de trofozoitos de la cepa PT-1 en forma "limax" en busca de alimento (contraste de fases 800 x).



Fig. 5. Grupo de trofozoitos de la cepa PT-1, en forma aplanada. Algunos alimentándose en forma activa y otros en proceso de división (contraste de fases 800 x).

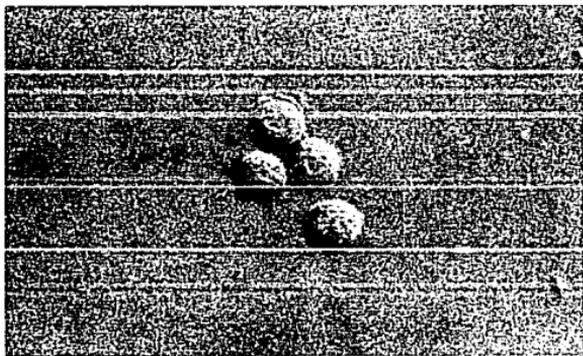


Fig. 6. Grupo de quistes de la cepa PT-1. No se observan poros en la superficie del quiste (contraste de fases 1 260 x).



Fig. 7. Micrografía de transmisión del trofozoito de la cepa PT-1. MV, estructuras semejantes a "copas" en la superficie de membrana celular; Mi, mitocondrias con crestas tubulares; N, núcleo; NI, nucleólo; V, vacuola digestiva; P, pseudópodo (5 800 x).

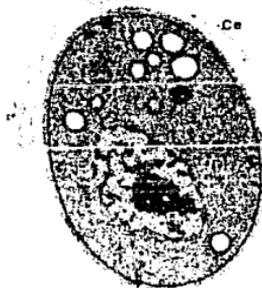


Fig. 8. Micrografía electrónica de transferencia mostrando la sección de un quiste de la cepa PT-1. Cc, capa externa de la pared del quiste; Ci, capa interna; N, núcleo con cuerpos conspicuos de cromatina extranucleolar; NI, nucleólo (12 000 x).

### - Quiste

Las secciones del quiste de forma ovalada mostraron dos capas, una interna y la otra externa. De gran interés es la capa externa de aspecto mucilaginoso, donde es posible observar separaciones y acercamientos ondulatorios con la capa interna del quiste (Fig. 8).

### ISOELECTROENFOQUE

Por isoelectroenfoque (IEF) con las enzimas Propionil Esterasa (PE), Fosfatasa ácida (FA) y Proteínas Totales (ProT) la cepa PT-1 fue contrastada con las cepas de referencia *Hartmannella vermiformis* de CCAP 1534/7A, CCAP 1534/7B y CCAP 1534/12 del catálogo Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP).

El patrón enzimático obtenido en geles preparados con anfólito de pH 4-6.5 correspondientes a las 3 cepas de referencia del CCAP comparado con el de la cepa PT-1 muestra una marcada diferencia con la enzima PE. El nivel de definición de 3 bandas como máximo para esta enzima facilita el diagnóstico de las especies.

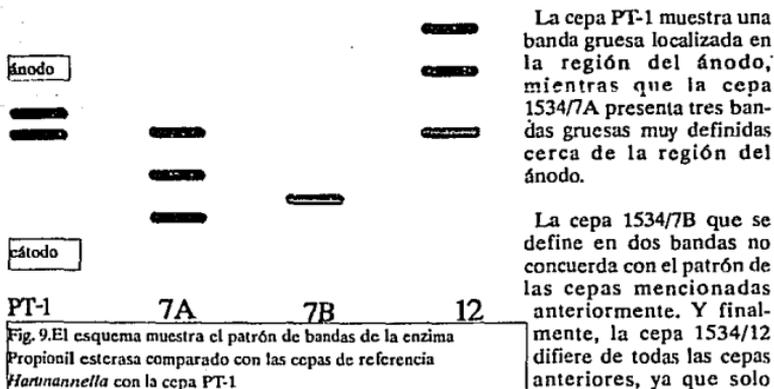


Fig. 9. El esquema muestra el patrón de bandas de la enzima Propionil esterasa comparado con las cepas de referencia *Hartmannella* con la cepa PT-1

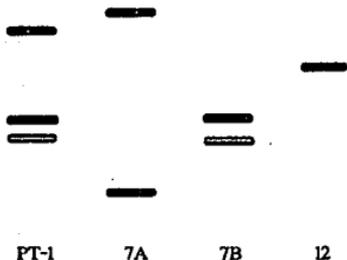


Fig. 10. Se muestra el gel de IEF para la enzima Fosfatasa ácida. La base corresponde al ánodo y la parte superior al cátodo.

Utilizando un anfolito con valores de pH de 3-10 con reveladores para la misma enzima PE probada anteriormente, se comprobó que las diferencias mostradas por la cepa PT-1 y las hartmannellas de referencia eran más evidentes (Fig. 9).

Tales diferencias en la secuencia de bandas es más aparente incluso entre las mismas cepas amebianas de referencia. La posición de las únicas 2 bandas en la cepa PT-1 deja una clara evidencia de la poca relación que existe con las otras cepas amebianas.

Al revelar la enzima FA a pH de 3-10 nuevamente pudimos observar hondas diferencias entre las cepas analizadas (fig. 10). La concordancia de dos bandas entre la cepa PT-1 y la cepa 7B no son argumento suficiente para sostener la posible relación entre estos dos tipos de organismos.

La enzima AlcDH no dió información ya que no se reveló en ningún ensayo.



Fig. 11. Proteínas totales pH 3-10. Cepa PT-1 comparada con Hartmannellas de referencia 7A, 7B y 12. En la base se encuentra la región del ánodo y hacia arriba el cátodo.

Por lo que respecta a ProT a valores de pH 3-10, el patrón de bandas es más complejo, y no es posible reconocer un esquema de similitud de secuenciación de bandeo entre las 4 cepas amebianas contrastadas (fig. 11). La resolución en el gel permitió, de manera normal encontrar diferencias sobre todo en aquellas bandas no empalmadas y por lo tanto más delgadas que significan cambios mínimos que un organismo puede manifestar y se detectan en ProT por la altísima sensibilidad del IEF.

#### - Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad de la cepa amebiana PT-1 ensayadas por inoculación intracerebral (IC) y por inoculación intranasal (IN) en ratones de 3 semanas de edad mostraron una virulencia muy alta. Los resultados se muestran en la tabla 3.

El 60% de todos los ratones experimentados por IC e IN murieron dentro de la primera semana, después de ser inoculados con una concentración de amebas de  $10^4$  y  $10^6$  células, el restante 40% murió en el lapso de la segunda semana.

Las amebas fueron recuperadas de los ratones muertos a partir del cerebro, pulmón e hígado en placas de NNE. En ningún ensayo se recuperaron amebas del órgano riñón.

#### - Cortes histológicos

Se demostró claramente en las preparaciones permanentes, la presencia de organismos solitarios en diferentes regiones del tejido observado. No se detectaron con frecuencia aglomerados de amebas como se ha encontrado en *Naegleria*.

Los tejidos en donde se encontró una mayor cantidad de amebas fueron principalmente pulmón y cerebro y en menor cantidad hígado y riñón.

El daño en los tejidos fue muy aparente, en algunos cortes los tejidos se mostraban necrosados y hemorrágicos con infiltrados inflamatorios. En estas zonas fue común encontrar formas tróficas y quísticas de la cepa PT-1. Los vasos sanguíneos fueron zonas de alta incidencia de amebas.

Tabla 3

**Prueba de patogenicidad en ratones de 3 semanas.**

**Inoculación Intracerebral**

Lote	Nº. de amebas inoculadas	% de Mortalidad	Recuperación de la capa en cerebro
1	5.6 X 10 <sup>4</sup>	100	negativa
2	2.3 X 10 <sup>4</sup>	80	positiva

**Inoculación Intranasal**

Lote	Nº. de amebas inoculadas	% de mortalidad	Recuperación	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	2.5 X 10 <sup>4</sup>	100	-	-	-	-	-
2	5.6 X 10 <sup>4</sup>	100	+	-	+	-	-
3*	2.3 X 10 <sup>4</sup>	60	+	-	+	-	-
Muerte por sacrificio del lote Nº. 3		40	+	+	+	+	-

\* Del lote No. 3 el 40 % de los ratones no murieron en el lapso de 21 días y fueron sacrificados con recuperación positiva de la ameba PT-1.

En pulmón y cerebro se observó el predominio de amebas en forma de trofozoito más que en forma de quiste, a diferencia del hígado y del riñón, donde la abundancia de formas estuvo constituida principalmente por quistes.

#### - Pruebas de sensibilidad a fármacos

En bioensayos de sensibilidad de la cepa PT-1 a diferentes concentraciones de fármacos, el comportamiento fue el siguiente (Fig. 12):

Los ensayos con trimetoprim/sulfometoxazol y clorhidrato de tetraciclina tuvieron un efecto moderado sobre las amebas al ser aplicados en concentraciones elevadas de 250 y 100 mcg/ml, el efecto produjo el enquistamiento de la cepa amebiana principalmente con trimetoprim, sin embargo, a las concentraciones de 8 y 25 mcg/ml el efecto fue nulo, y en esos cultivos se encontraron formas tróficas y un crecimiento aparente con ambos antibióticos.

En pruebas con quistes, estos antibióticos no tuvieron ningún efecto y en algunos casos a concentraciones bajas hubo exquistamiento de las amebas. A las 48 horas después de remover los antibióticos la recuperación de las amebas fue total encontrando todas las amebas en forma trófica.

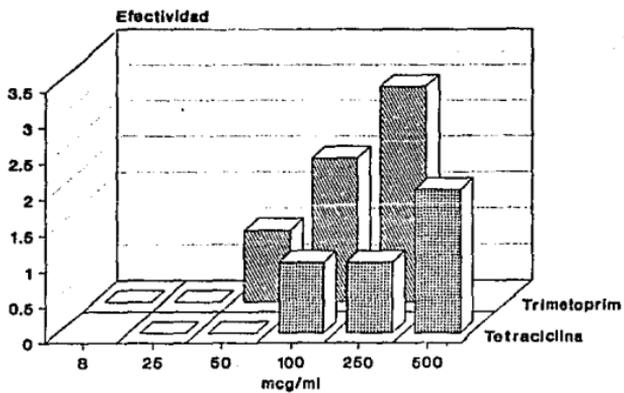
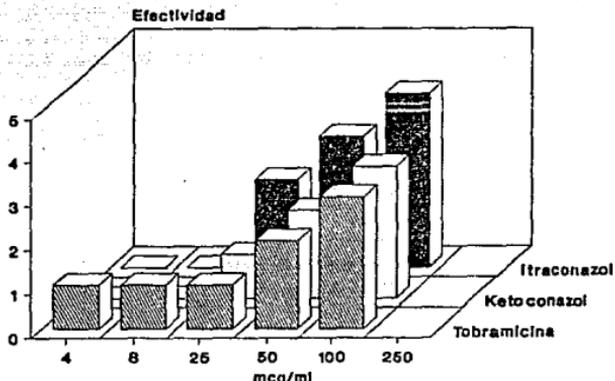
Los antibióticos Ketoconazol y Tobramicina tuvieron un efecto tóxico muy moderado a concentraciones altas sobre los trofozoitos, el efecto se pudo observar a través del tiempo, ya que a las 24 horas estos antibióticos no mostraron tener efecto alguno en todas las concentraciones sobre las formas tróficas.

A las 48 horas los trofozoitos mostraron una tasa de enquistamiento muy elevada a las concentraciones de 100 y 50 mcg/ml del antibiótico, pero a medida que la concentración fue disminuyendo a 25, 8 y 4 mcg/ml, los antibióticos no tuvieron efecto.

La acción de la Tobramicina no exhibió ningún efecto sobre los quistes y estos exquistaron de manera inversamente proporcional a la concentración del antibiótico. El Ketoconazol tuvo un fuerte impacto en los quistes sólo a las 48 horas después de ser aplicado.

Fig. 12

### Pruebas de sensibilidad a antibióticos



**El antibiótico Itraconazol aplicado en concentraciones de 100, 50 y 25 mcg/ml tuvo un efecto devastador sobre la población de trofozoitos a las 24 horas. A dosis menores de 8 mcg/ml se encontraron trofozoitos en buenas condiciones. 24 horas después del lavado del antibiótico la recuperación de los trofozoitos fue total a las 24 horas. El Itraconazol no tuvo efecto sobre los quistes a ninguna de las concentraciones.**

## Resumen de las características de la cepa PT-1

### Hábitat

Aislada de Líquido Cefalorraquídeo de un paciente de 18 años de edad

### Tolerancia a la Temperatura

Tolera hasta los 47 °C Crecimiento óptimo a 37 °C.

### Transformación amebo-flagelar

No flagela.

### División

Mitosis de tipo abierta (desaparece la membrana nuclear). La división sólo se lleva a cabo en la fase trófica.

### Patogenicidad

Patógena en ratones de 3 semanas de edad.

### Curso de la enfermedad

Produjo la muerte del paciente en 10 semanas, después de su ingreso al Hospital.  
En parte de los ratones inoculados la muerte sobrevino durante la primera semana.

### Ruta de infección

Epitelio orofaríngeo Fumon y/o SNC desplazándose a otros órganos (hígado y riñón).

### Resistencia a fármacos

Poco sensible a los fármacos probados.

### Trofozoito

Forma. Presenta 2 formas típicas, una de verdadera límax y otra aplanada (en etapa de reposo).  
Pseudópodos en forma de lobópodos.  
Tamaño. Forma límax 16.45  $\mu\text{m}$  x 5.6  $\mu\text{m}$  Núcleo 4.08  $\mu\text{m}$  de diámetro.  
Microscopía electrónica Mitochondrias elípticas u ovals con crestas tubulares.  
Carece de Aparato de Golgi. En la superficie celular aparecen finas microvellosidades.

### Quiste con la microscopía de luz y electrónica

Forma ovoide y redonda. Prequiste y quistes maduros respectivamente.  
Quistes maduros con una cubierta ondulante mucilaginoso muy aparente. No hay poros.  
Tamaño 14.48  $\mu\text{m}$  de diámetro. Con la microscopía electrónica:  
Forma ovalada con cuerpos conspicuos de cromatina extranuclear entre la membrana nuclear y el nucleolo. Aparición de una capa interna y otra externa (mucilaginoso). Uninucleado.

---

## DISCUSION

---

El objetivo de este trabajo se ha dirigido a la identificación de una ameba de vida libre que fue aislada continuamente a partir de 3 muestras de LCR de un paciente masculino de 18 años internado en el Hospital Universitario de Puebla.

La ameba aislada de LCR fue denominada en nuestro laboratorio cepa PT-1.

### CONSIDERACIONES CLINICAS

De manera consistente en este trabajo se ha hecho hincapié en que el diagnóstico primario de la enfermedad del paciente fue meningoencefalitis. En el hospital de manera rutinaria por la sintomatología observada se hicieron análisis de laboratorio en búsqueda de bacterias principalmente micrococcos, organismos relacionados con este tipo de infección.

Sin embargo el hallazgo de una ameba de vida libre en LCR y la ausencia de virus y bacterias en el individuo nos llevaron a pensar que el agente etiológico de la enfermedad era una ameba.

Con este conocimiento se elaboró el nuevo diagnóstico y se propuso la posibilidad de una infección atípica de MEAP causada por *Naegleria fowleri*. Sin embargo, el curso clínico de la enfermedad fue complejo y mostró algunos rasgos de evolución de las infecciones causadas por *Acanthamoeba* en EAG.

El único factor de predisposición física para contraer la enfermedad del tipo EAG es el factor de desnutrición grado I presentado por el paciente. El desarrollo de la enfermedad puede ser

descrita como el de una meningoencefalitis amebiana crónica MEAC.

El examen de la citología y química sanguínea del paciente muestra una estrecha semejanza con aquellos análisis llevados a cabo en personas que presentaron MEAP, especialmente en el aumento de linfocitos y niveles de proteínas en el LCR. Asimismo, los bajos niveles de glucosa, gran cantidad de partículas celulares y neutrófilos, apoyan la citología amebiana.

La etiología viral y bacteriana se descartó completamente en los análisis hechos en el hospital.

Un elemento importante de considerar es que el paciente no presentaba SIDA, ni ningún otro factor de compromiso con su sistema inmune. Sin embargo, el tratamiento aplicado al paciente fue muy agresivo, dado que se incluyó una fuerte y prolongada terapia inmunosupresora con dexametasona que alteró el curso de la enfermedad y seguramente favoreció la dispersión del parásito desde el sistema nervioso central (SNC) a otros órganos incluyendo pulmón, el cual finalmente fue el centro de graves complicaciones provocando bronconeumonía y finalmente la muerte del paciente.

Al hacer el estudio epidemiológico del caso no fue posible establecer el momento de la infección; sin embargo, se supo que el joven tenía la costumbre adquirida meses antes de presentar la enfermedad, de sumergir la cabeza en una pileta de agua estancada y expuesta al aire libre. Este episodio puede posiblemente explicar la manera de infección.

Las amebas pudieron infiltrarse del agua del estanque por la nariz y a través del epitelio olfatorio hasta el sistema nervioso. Al llegar al cerebro se produjo una meningoencefalitis de evolución crónica y gran proliferación de amebas en forma trófica con desplazamiento generalizado por el LCR. Se puede enunciar la hipótesis de que durante este proceso las amebas PT-1 se difundieron al pulmón causando la severa bronconeumonía que finalmente provocó el deceso del paciente.

Consideramos que en esta fase los trofozoítos fueron difícilmente visibles para un analista de laboratorio no entrenado

en este campo, dado que pueden ser confundidos fácilmente con macrófagos o artefactos celulares. Por esta razón 10 días después del ingreso del paciente al HUP se llevaron las muestras al laboratorio del Proyecto CyMA y no se intentó el tratamiento en contra de amebas de vida libre 2 días después.

Con estos antecedentes se hicieron varios muestreos microbiológicos en la pileta de agua donde el paciente acostumbra sumergir la cabeza, en busca de alguna posible relación con la ameba aislada.

Se detectaron en dicha pileta varios organismos pertenecientes a los organismos de los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella*.

Hacemos énfasis en que el aislamiento repetido a partir del LCR de la cepa amebiana PT-1, las pruebas positivas de patogenicidad y la ausencia de bacterias y algún otro patógeno sustentan de manera sólida que este organismo amebiano fue el agente etiológico responsable de la enfermedad y posteriormente de la muerte del paciente. Asimismo, se descarta cualquier tipo de contaminación externa.

#### IDENTIFICACION DE LA CEPA PT-1

Hasta hace poco tiempo las amebas de vida libre con potencial patógeno para los seres humanos estaban restringidas a un par de grupos. Generalmente, se asumía que una ameba patógena sólo podía pertenecer a los géneros *Naegleria* o *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 1984). Sin, embargo este concepto ha cambiado por el descubrimiento de que otros organismos de diferentes géneros pueden causarle al hombre patologías severas e inclusive la muerte. Estos organismos pertenecen a los géneros *Leptomixa*, *Vahlkampfia* (Jaramillo, 1989) y ahora *Hartmannella*.

Sobre la base de este problema, se trata de establecer la situación taxonómica de la ameba encontrada responsable de una meningoencefalitis amebiana en un paciente del Estado de Puebla, considerando a los patrones de clasificación taxonómica tradicionales como base, pero, analizando a detalle las diferencias finas a niveles molecular ultraestructural y bioquímico de la ameba aislada.

En el proceso de identificación la cepa PT-1 mostró un polimorfismo excepcional, sin embargo, la forma limax (alargada) fue la más característica. En esta forma, su desplazamiento fue muy rápido por la formación de lobópodos. Nunca se observaron estructuras parecidas a filópodos o acantópodos.

En la fase de quiste la forma adquirida fue más bien ovoide y lisa formando un exoquiste y un endoquiste corriendo paralelos y lisos. La falta de brazos estrellados en el endoquiste y de filópodos son el criterio principal para descartar a la cepa PT-1 como un organismo del género *Acanthamoeba* causante de EAG.

La posibilidad de relacionar a la PT-1 con *Naegleria fowleri* causante de MEAP fue analizada contrastando la capacidad de ambos tipos de amebas a los ensayos básicos de laboratorio, tolerancia a la temperatura, transformación ameboflagelar y morfometría (Griffin, 1972).

La máxima temperatura que soportó la cepa PT-1 fue de 47 °C esta cualidad es importante considerando el criterio adoptado en protozoología para las amebas de vida libre de que la potencialidad de que un organismo sea virulento aumenta cuanto mayor sea su capacidad de soportar temperaturas altas (entre los 42 y 45 °C), aquí se incluye *N. fowleri*.

La prueba de transformación ameboflagelar demostró la incapacidad de PT-1 para formar flagelos temporales, a diferencia de *N. fowleri* que sí los produce, además debe resaltarse la ausencia de poros en el quiste de PT-1, en observaciones por microscopía de luz, lo que posteriormente se comprobó por microscopía electrónica. El quiste de *N. fowleri* sí presenta poros en su superficie (Page, 1975).

También por morfometría se encontraron diferencias excepcionalmente marcadas entre ambos tipos de amebas. El tamaño pequeño de *N. fowleri* con un quiste de 10  $\mu\text{m}$  y un tamaño de trofozoíto de 15  $\mu\text{m}$  en promedio, contrasta con el quiste de PT-1 de 10.22  $\mu\text{m}$  en promedio y el trofozoíto en forma limax hasta de 35  $\mu\text{m}$ . Con estas diferencias pudimos concluir que la cepa PT-1 no pertenece al género *Naegleria* (Page, 1988).

Dado que la cepa PT-1 no correspondía por morfofisiología a los géneros que comúnmente están involucrados en casos de meningoencefalitis, se sugirió un estudio más profundo e integral de esta importante ameba.

### Morfología

La observación por microscopía de luz mostró en los trofozoítos de las amebas una constante forma limax verdadera en forma de cilindro, excepcionalmente alargada llegando a medir en esta fase hasta 36  $\mu\text{m}$ .

La locomoción recta por pseudópodos hialinos generados siempre hacia el frente fue muy rápida. En estado de reposo cuando las condiciones son favorables y tiene un aporte de alimento (bacteria *E. coli*) abundante, la célula adquiere una forma flotante algo redonda que mide en promedio 23  $\mu\text{m}$ .

La ameba es uninucleada con un nucléolo central, y no hay división nuclear en la forma quística. En el proceso de división se observaron cambios a nivel del núcleo, la cromatina comienza a dispersarse y el núcleo no se ve tan definido, es decir se pierde el contorno de su pared nuclear y la cromatina contenida en el nucléolo se alarga y adopta una forma de media luna concentrándose a un lado del núcleo. Esta particularidad no se ha reportado para la subclase Gymnamoebia.

Durante el proceso de división se desintegra completamente la membrana nuclear (mitosis de tipo abierta), a diferencia de la Familia Vahlkampfiidae donde la membrana nuclear permanece intacta hasta la separación de los núcleos (mitosis cerrada). En algunos organismos fue posible observar la formación de un huso mitótico.

Contrastando todos los elementos claramente documentados con la clave taxonómica de Page (1988) de gimnamebas es posible ubicar a la cepa PT-1 en el género *Hartmannella*.

La descripción de la cepa PT-1 muestra semejanzas con *H. vermiformis*. Principalmente a nivel de morfología y de locomoción.

La descripción para *H. vermiformis* es:

Capa hialina usualmente presente, la profundidad anteroposterior lo doble del ancho; longitud de 12 a 37  $\mu\text{m}$ ; Núcleo de 2.1 a 4.1  $\mu\text{m}$ ; no hay cristales; los quistes son esféricos o ligeramente ovoides, con una capa de la pared externa muy poco separada, diámetro de 4.0 a 9.5  $\mu\text{m}$  (promedio de 7.0  $\mu\text{m}$ ).

Debe mencionarse aquí que aunque estas amebas limax habfan sido encontradas anteriormente en las mucosas nasales de seres humanos (Cerva, 1973; Skocil, 1972), no existen reportes que demuestren su comportamiento como un organismo patógeno para el humano ni para ningún otro organismo. Los estudios para las amebas del género *Hartmannella* las describen como organismos inocuos encontrados comúnmente como habitantes del suelo.

#### Ultraestructura

La utilización de la microscopía electrónica fue una de las herramientas más útiles en el proceso de ubicación taxonómica de la cepa amebiana PT-1.

Durante mucho tiempo los géneros amebianos *Acanthamoeba* y *Hartmannella* se habían clasificado indistintamente como organismos de este último género (Eusminger, 1966; Band, 1965); sin embargo, Page (1985), basándose en el tipo de división celular y principalmente en sus estudios de microscopía electrónica definió los límites del género *Hartmannella*.

De esta manera la ultraestructura permitió ubicar con mayor certidumbre a la cepa PT-1 dentro del género y la especie *Hartmannella vermiformis* por la morfología de sus estructuras.

#### Quiste.

Con un ámbito de tamaño de 7.71-12.85  $\mu\text{m}$  los quistes son ovoides. Por ultraestructura aparecen 2 paredes lisas. Los quistes maduros muestran una membrana poco densa que sobresale de manera envolvente, en un tamaño similar al radio del quiste (Fig. 8). Esta capa membranosa aparece también en *H. cantabrigiensis*; sin embargo, es más ondulante y se estrecha más hacia el quiste.

El quiste de la cepa PT-1 no tiene poros, lo cual corresponde a la misma característica de la Familia Hartmannellidae.

El núcleo del quiste de la PT-1 exhibe cuerpos conspicuos de cromatina extranucleolar en el mismo patrón que tiene la ameba *H. vermiformis* de referencia CCAP 1534/7A.

#### Trofozoito.

Las características más significativas observadas por microscopía electrónica se concentraron en las mitocondrias y en la superficie de la membrana celular.

Las mitocondrias de la PT-1 de formas ovales y alargadas con crestas tubulares. Estas crestas tienen importancia en el criterio adoptado para identificar a la cepa PT-1 como una ameba del género *Hartmannella*.

En el estudio ultraestructural de *Hartmannella* realizado por Page se describen crestas mitocondriales tubulares como una forma común encontrada en *Hartmannella*.

Tal vez el hallazgo más importante que se obtuvo por ultraestructura fue el descubrimiento de finas estructuras semejantes a copas sobre la superficie de la membrana celular de la PT-1 (Fig. 7). Estas "copas" diseminadas de manera continua en la membrana sólo son visibles a grandes aumentos 6 000 X.

Se ha observado de manera invariable que el género *Hartmannella* posee a lo largo de toda su membrana diminutas microfibrillas en forma de cáliz, la presencia de estas pequeñas fibrillas es distintivo del género, no se han encontrado en otra especie de amebas (Page 1988).

Este argumento nos ayuda a solidificar el diagnóstico morfológico de la cepa PT-1 como una ameba del género *Hartmannella*.

Al comparar la descripción por ultraestructura de la cepa PT-1 con la descripción del género *Hartmannella* por Page, sólo encontramos una diferencia en cuanto al Aparato de Golgi. Page

demuestra su presencia en *H. cantabrigiensis* y en *H. vermiformis* en diferentes regiones de la célula y también en número variable, sin embargo no se encontró Aparato de Golgi en diferentes secciones y ángulos de corte en la cepa PT-1.

#### Isoelectroenfoque (IEF)

Conociendo la situación taxonómica de la cepa PT-1 dentro del género y especie *H. vermiformis*, se esperaba que al comparar el patrón de bandas por IEF de la cepa PT-1 con aquellos de 3 cepas de referencia *H. vermiformis* de catálogo no hubiera muchas diferencias.

Los patrones de corrimiento de PE, FA y ProT a pH 4-6.5 y 3-10 mostraron marcadas diferencias. Es sorprendente también que las cepas de referencia 1534 /7A, /7B y /12 catalogadas como *H. vermiformis* fueran tan diferentes. Se deben discutir los puntos de divergencia estructural y fisiológico de estas cepas, para establecer su relación o en su caso la necesidad de hacer una nueva descripción y revisar su posición taxonómica.

Por lo que respecta a la cepa PT-1 reconocemos que las diferencias bioquímicas, evidenciadas por el comportamiento de los patrones enzimáticos, pueden ser explicadas porque el aislamiento de esta ameba se hizo a partir de un organismo vivo, por su carácter patógeno evidente en un paciente y comprobado en animales de experimentación, carencia de aparato de Golgi, mantenimiento controlado en laboratorio y la capacidad de desplazamiento rápido inusual en el género *Hartmannella*.

Por estas consideraciones podemos sugerir que la cepa PT-1 diagnosticada como *Hartmannella vermiformis*, con base en sus finas diferencias morfofisiológicas puede ser considerada como una nueva variedad (o subespecie).

#### PRUEBA DE PATOGENICIDAD

La importancia de la prueba de patogenicidad en ratones es manifiesta. En 5 pruebas, combinando inoculación nasal e inoculación intracerebral de amebas PT-1, el porcentaje de ratones muertos durante la primera semana de inoculación superó el 80 % lo que demuestra su alta virulencia tabla 3.

La recuperación de amebas en forma trófica a partir de cerebro, pulmón e hígado demuestran la capacidad de desplazamiento de esta cepa. Este hecho es sorprendente dado que *H. vermiformis* no había sido reportada anteriormente como patógeno.

Esta conclusión nos ayuda a sostener la hipótesis de que la cepa PT-1 fue el factor determinante en la muerte del paciente de Puebla. Consideraciones posteriores relacionadas con este tema se harán en el siguiente apartado.

### CORTES HISTOLOGICOS

Al carecer de un examen post-mortem para comprobar la muerte del paciente de Puebla por la cepa amebiana PT-1, y para ayudarnos a comprender el mecanismo de dispersión y daños causados por esta ameba en los diferentes órganos de un ser viviente, se realizó el examen de cortes histológicos preparados a partir de ratones inoculados con esta cepa.

En tejidos de pulmón y cerebro fue donde se encontró gran cantidad de amebas en forma trófica, esta observación es importante porque relaciona la presencia de la ameba en cortes de pulmón con las alteraciones respiratorias graves del paciente (bronconeumonía), reportadas en la historia clínica.

De manera constante se observaron organismos solitarios en los tejidos a diferencia de lo reportado para otras amebas patógenas que frecuentemente se aglutinan en un sitio para causar el daño. Este hecho puede deberse a diferencias en los mecanismos de patogenicidad. Pudiendo elaborar toxinas o enzimas que actúan a distancia necrotizando el tejido.

En la inoculaciones por vía intranasal las amebas pasan al cerebro de manera muy rápida y directamente al pulmón (lo que se comprobó por el elevado número de organismos encontrados en estos tejidos) y por vía hematógena se diseminan a hígado y a riñón.

El tamaño de los organismos amebianos se vio afectado porque las condiciones dentro de los tejidos pueden ser de tensión debido

a condiciones microaerófilas o por la presión que ejercen las células de defensa del organismo.

### **SENSIBILIDAD A FARMACOS**

El Ketoconazol e Itraconazol no afectaron al quiste como era esperado (estos medicamentos son utilizados contra hongos ya que actúan específicamente sobre su pared de celulosa, lo que confirma que la pared externa del quiste no está constituida por celulosa.

El tamaño de los trofozoitos y quistes se vio afectado por la presencia de antibióticos. Este mecanismo de generar células pequeñas es común en los protozoos como dispositivo de defensa contra las condiciones adversas del medio. Al producirse células en abundancia, aunque más pequeñas, aumenta la probabilidad de alcanzar otros hábitats que les sean más favorables para de esta manera preservar la especie, este mecanismo se denomina estrategia de adaptación.

En general los medicamentos no mostraron un efecto deletéreo sobre este organismo amebiano PT-1 lo que motiva a seguir en la búsqueda de nuevos medicamentos que puedan ser eficaces en el tratamiento de enfermedades producidas por amebas patógenas de vida libre.

---

## CONCLUSIONES

---

El desarrollo de nuevas técnicas, como el isoelectroenfoque enzimático, la prueba de ELISA, mapeo genético del ADN, pruebas inmunológicas avanzadas, microscopía electrónica, etc. han facilitado por una parte la separación precisa de diferentes grupos de protozoos muy relacionados entre sí, pero por otra parte han complicado la toma de decisiones para resolver hasta qué punto las diferencias más finas entre dos organismos los separan de la misma especie (De Jonckheere, 1987; Martínez, 1976).

Los criterios adoptados han sido múltiples de tal manera que la interpretación de la posición de un organismo en el sistema taxonómico difiere dependiendo del autor (Rivera, 1978).

De esta manera la separación de especies principalmente entre los organismos de las familias Acanthamoebidae, Vahlkampfiidae y Hartmannellidae ha proliferado y se han hecho nuevas descripciones basadas en diferencias morfológicas y bioquímicas muy finas.

Estas consideraciones son de gran importancia para la conclusión de este trabajo, puesto que el objetivo de ubicar taxonómicamente a la cepa PT-1 nos ha motivado a seleccionar cierto tipo de características morfológicas y bioquímicas de esta cepa amebiana para clasificarla como *Hartmannella vermiformis*. Sin embargo, nos hemos encontrado un número de diferencias al comparar las descripciones hechas para varias *H. vermiformis* (Page, 1985) de referencia con la cepa PT-1.

La velocidad de locomoción inusualmente rápida para *Hartmannella*, su rapidez para transformarse en limax a casi cualquier cambio en el ambiente, el patrón isoenzimático y de protefnas y su patogenicidad en animales de experimentación, así como el daño causado en los tejidos, nos hacen suponer que la cepa PT-1 catalogada como *Hartmannella vermiformis*, presenta otras características que no son compartidas por las tres *H. vermiformis* de referencia.

Estos factores deben ser interpretados y analizados en un nuevo trabajo, estudiando más profundamente la ultraestructura, bioquímica, inmunología y ADN de la cepa PT-1. Ya que hasta el momento, consideramos con gran certidumbre que la cepa ameibiana PT-1 corresponde a una nueva subespecie con nuevas características atractivas para ser estudiadas y ser descritas en un trabajo posterior.

Asimismo, debemos fijar nuestra atención a las adaptaciones evolutivas de estos organismos anfitriónicos es decir con la capacidad de transición para convertirse de un organismo de vida libre a uno parásito facultativo del hombre.

Existen trabajos que documentan a los organismos del género *Hartmannella* como parte de los microorganismos que pueden habitar normalmente en la faringe del hombre sin causar daño (Wang, 1967). Sin embargo, y al respecto de este caso se sugiere la posibilidad de que *Hartmannella* esté comenzando a invadir nuevos hábitats y sea capaz de sobrevivir en aquellos ambientes donde las condiciones adecuadas de humedad, alimento y temperatura le permitan desarrollarse.

Se ha demostrado también que las *hartmannellas* poseen un aparato enzimático muy eficiente para atravesar grandes zonas de tejido y digerir de manera rápida gran cantidad de células. Otra de las manifestaciones de la cepa PT-1 es su excepcional afinidad por el tejido del sistema nervioso central. No se han hecho investigaciones para determinar los mecanismos de selección que le facilitan a la cepa PT-1 empezar a destruir células nerviosas.

Esta reflexión coincide con la significativa especificidad que exhibió la cepa PT-1 para crecer axénica en determinados medios de cultivo que incluyen en su composición ADN.

Como se ha señalado anteriormente, hemos catalogado a la cepa PT-1 dentro del género *Hartmannella* y queremos resaltar la íntima relación que tiene con los organismos del género *Acanthamoeba* cuya alta patogenicidad ha sido demostrada en cientos de pacientes con otitis, rinitis, queratitis y EAG entre otras infecciones, incluyendo además a los pacientes asintomáticos (Rivera, 1984).

Todo esto nos hace suponer un proceso evolutivo paralelo muy cercano entre ambos géneros. De tal manera que sólo hasta años recientes Page (1988) ha reclasificado dentro del género *Hartmannella* a varias amebas que por años habfan sido consideradas como *Acanthamoebas*.

En nuestra consideración queremos destacar el reporte y la descripción de una enfermedad atípica de sintomatología no común en EAG y MEAP causada por una ameba de vida libre caracterizada como *Hartmannella vermiformis*. Esta ameba fue aislada de LCR de un paciente que murió 10 semanas después de haber mostrado los primeros síntomas de meningoencefalitis. El episodio fue causado por un organismo nunca antes descrito como agente patógeno.

Los antecedentes mostraron que el paciente tuvo contacto con agua estancada de una pileta, en la cual se encontraron consistentemente amebas de vida libre incluyendo especies del género *Hartmannella*. Esta evidencia nos da un argumento para confirmar la hipótesis de que el paciente adquirió la enfermedad por sumergir la cabeza en este estanque.

El uso de la microscopía electrónica como una herramienta para el estudio de este caso de difícil diagnóstico fue de gran utilidad en particular cuando se trató de clasificar al agente etiológico. Y debe ser parte del diagnóstico rutinario de laboratorio en casos similares.

Las observaciones en los cortes histológicos confirmaron el curso clínico de la enfermedad, coincidiendo con el cuadro clínico presentado por el paciente. Y se concluye que el agente causante de la muerte del paciente fue una ameba anfizoica de la especie *Hartmannella vermiformis* nueva variedad que le provocó

al paciente un cuadro de meningoencefalitis y bronconeumonía que lo llevaron a la muerte.

A medida que los profesionistas relacionados con el área biomédica de todo el mundo, empiezan a preocuparse por esta enfermedad, el número de casos diagnosticados va en constante aumento, pero aún no se refleja el número real a nivel mundial.

Considérense las siguientes reflexiones:

a) El grupo médico no considera formalmente a las amebas patógenas de vida libre como causantes frecuentes de meningoencefalitis. De manera general el diagnóstico primario se determina como una etiología de origen bacteriano o viral, por lo tanto los pacientes reciben terapias muy agresivas que debilitan al paciente y pueden favorecer aún más (cuando este sea el caso) la invasión por amebas.

b) Existe la necesidad de que los médicos y el personal que realiza los análisis de laboratorio sean entrenados en la identificación de la sintomatología y en la detección de estos organismos de difícil diagnóstico.

c) Cuando el diagnóstico de la enfermedad sea de meningoencefalitis, se deben incluir de manera rutinaria análisis de laboratorio en busca de protozoos, especialmente en LCR.

d) Debido a la ubicuidad de estos organismos se hace patente la necesidad de levantar un inventario de estas amebas en nuestro país para que de esta manera podamos prevenir y conocer los alcances de esta enfermedad así como la distribución y ecología de las amebas de vida libre patógenas.

Los señalamientos anteriores, sin embargo, no deben ser tomados como de alarma debido a que esta enfermedad rara vez aparece en forma de brotes epidémicos y hasta la fecha no se considera un problema de salud pública.

Adicionalmente en este trabajo se quiere llamar la atención sobre el curso de la enfermedad, su diagnóstico así como el o los agentes que la pueden provocar. También se hacen señalamientos

para el aislamiento y la identificación de las amebas patógenas de vida libre capaces de causar diversos tipos de meningoencefalitis.

En ello trabajan equipos multidisciplinarios, intercambiando información sobre aspectos de biología molecular, epidemiología, inmunología y farmacología para establecer un mejor conocimiento sobre las meningoencefalitis producidas por amebas de vida libre patógenas especialmente en nuestro medio tan favorable a estos organismos por la ubicación geográfica y las excelentes condiciones climáticas que prevalecen en nuestro país.

---

## REFERENCIAS

---

Band, R.N. 1963. Extrinsic requirements for encystation by the soil amoeba, *Hartmannella rhysodes*. *J. Protozool.* **10**, (1): 101-106.

Butt, C. 1966. Primary amoebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **274**: 1473.

Carter, R.F. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental changes induced by it. *J. Pathol.* **100**: 217-244.

Červa, L. y Novak, K. 1968. Amoebic meningoencephalitis. Sixteen fatalities. *Science* **160**: 92.

Červa L., Serbus C. and Skocil V. 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitologica.* **20**: 97-103.

Culbertson, C.G., Smith, J. & Minner, J. 1958. *Acanthamoeba* Observations on Animal Pathogenicity. *Science.* **127**:1506.

Culbertson, C.G. 1975. Soil amoebae infection. *Amer. J. of Clinical Parasitol.* **63**, (4): 475-482.

De Jonckheere, J.F. 1987. Taxonomy. *From amphizoic amoebae. Human pathology.* Ed. by Rondanelli, E.G. Chapter 2. Puccin Nuova Libreria. Padova Italy. 25-48.

De Jonckheere, J.F. 1978. Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica.* **14** (4): 475-481.

De Jonckheere, J.F. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol.* 130 B: 205-212.

De Jonckheere, J.F. 1981. Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.*, 28(1): 56-59.

De Jonckheere, J.F. 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol.* 133: 319-342.

De Jonckheere, J.F. 1984. Postgraduate course on biochemical techniques for the diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. UNAM. México: 70 pp.

Ensminger, P.W. and Culbertson, C.G. 1966. *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). *Amer. J. of Clinical Pathol.* 46 (4): 496-499.

Fernández-Galiano, D. 1979. *Las amebas anfitróficas del hombre*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid. 28 pp.

Ferrante, A., Kelly, R.B. and Thong, H.Y. 1984. In vitro sensitivity of virulent *Acanthamoeba culbertsoni* to a variety of drugs and antibiotics. *Int. J. for Parasitol.* 14 (1): 53-56.

Griffin, J.L. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* 178: 69.

Jadin, J.B. & Willaert, E. Au sujet de la dispersion des amibes du groupe "limax". *Protistologica*. 4: 505-508.

Jaramillo, Y.R., Chávez, M.G., Olvera, J.R. y Martínez, J.A. 1989. Encefalitis por una nueva amiba de vida libre, probablemente *Leptomyxa*. *Patología*. 27: 137-141.

John, D.T. & De Jonckheere, J.F. 1985. Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma lake. *J. Protozool.* 32(4): 571-575.

Kusprzak, W., Mazur, T. & Cerva, L. 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitologica* 29: 211- 218.

Kyle, J. & Pittman, N. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J. Protozool.* 32(1): 99-105.

Kyle, J. & Pittman, N. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's pond. *J. Protozool.* 33(3): 422-434.

Kyle, J. & Pittman, N. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J. Protozool.* 34(1): 10-15.

Lee, J.J., Hutner, S.H. & Bovee E.C. 1988. An Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologist, Kansas. USA. 622 pp.

López-Corella, E., De León, B. B. y De Jonckheere, J.F. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo Michoacán México. *Bol. Med.Hosp. Infant. Mex.* 46 (9): 619-622.

Martínez, A.J., Dos Santos, J.G., Nelson, E.C., Stamm, W.P. & Willaert E. 1977. Primary amoebic meningoencephalitis. In Sheldon, S.S. & Rosen, P.P. Pathology Annual Part 2. Vol. 12. Appleton-Century Crofts. New York. 225-248.

Martínez, A.J. Fultz, D.G. & Armstrong, C.E. 1976. The value of electron microscopy in the differential diagnosis of amoebic meningoencephalitis. "24<sup>th</sup> Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer." Miami Beach, Florida, G.W. Bailey (ed.). 226-227.

Martínez, J.A. y Amado-Ledo, E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amebas de vida libre. *Protozoología, Epidemiología y Neuropatología. Morfología Normal y Patológica.* sec. B 3: 679-704.

Martínez, A.J. 1985. Free-living amebas: Natural history prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press. Florida. 156 pp.

Mascaró M.L., Mascaró M.C., Osuna A., Pérez M.I. and González Castro. 1986. Study of an ameboflagellate isolated from the nasal mucosa of man. *J. Protozool.* 33 (1): 89-93.

Neal, B.R. 1963. Extrinsic requirements for encystation by the soil amoebae, *Hartmannella rhysodes*. *J. Protozool.* 10(1):101-106.

Page, F.C. 1975 Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica*. 11(2): 195-204.

Page, C.F. 1985. The limax amoebae: Comparative fine structure of the Hartmannellidae (Lobosea) and further comparisons with the Vahlkampfiidae (Heterolobosea). *Protistologica*. 21 (3): 361-383.

Page, C.F. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association Scientific Publication. England. 122 pp.

Pussard, M. 1973. Modalités de la division nucléaire et taxonomie chez les amibes (Amoebae, Protozoa). Révision des notions de promitose, mesomitose et métamitose. *Protistologica* 2: 163-173.

Rivera, F. y Paz, E. 1978. Discusión y comentarios sobre los criterios taxonómicos para las amibas del grupo "limax". *Arch. Mex. Anat.* 15 (3): 72-82.

Rivera, F., Paz E. y López-Ochoterena, E. 1978. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en especies del género *Naegleria*, Alexieff (1912), recolectadas en piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. *Arch. Mex. Anat.* 15 (1): 9-19.

Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. & Paz, M.E. 1979. A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap water in Mexico City. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 28(3): 465-469.

Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal, P., González, L. & Lacy, A.M. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* 28(1): 54-56.

Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. & Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ. Res.* 32: 205-211.

Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. & Robles, E. 1983. Pathogenic and Free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ. Res.* 33: 428-440.

Rivera, F., Romero, R. y Medina, F. 1984. Meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. de Medicina. México.* 27(3): 113-122.

Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E. & Bonilla, P. 1986. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water Air and Soil Pollut.* 28: 185-198.

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. & Lares F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.* 42 : 149-154.

Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón A., Martínez, J., Rodríguez S. & Alcocer, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ. Res.* 50: 289-295.

Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchitua, L. y Calderón, A. 1989. Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeningocele, por *Naegleria lovaniensis*. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.* 2(9): 91-94.

Rodríguez, P.E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*: informe de un caso. *Infectología.* 4 (10): 263-266.

Rondanelli, E.G. 1987. Infectious diseases. 1. Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova Libreria. Padua Italy. 279 pp.

Rutherford, G.S. 1986. Amoebic meningo-encephalitis due to a free-living amoebae (case report). SAMI DEEL 62 (4): 51-53.

Singh, B.N. & Hanumaiah, V. 1979. Studies on pathogenic and non-pathogenic amoebae and the bearing of nuclear division and locomotive form and behaviour on the classification of the order Amoebozoa. Monograph No. 1, Association of Microbiologists of India, Ind. J. Microbiol.: 80 pp.

Skocil, V., Dvorak, R., Sterba, J., Slajs, J., Serbus, C. & Cerva, L. 1972. Epidemiological study of the incidence of amoebae of the limax group in military communities. J. of Hyg. Epidemiol. Microbiol. and Immunol. 16: 101-106.

Tarauto, A.L., Monges, J., Acefe, J.C., Meli, F., Paredes, A. & Martínez, A.J. 1991. Leptomyxid amoebae encephalitis: report of the first case in Argentina. Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 85: 77.

Thong, Y.H. & Ferrante, A. 1987. Experimental pharmacology. In Rondanelli, 1987. Infectious diseases. 1. Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova Libreria. Padua Italy. 279 pp.

Valenzuela, G., López-Corella, E. y De Jonckheere, J.F. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 78: 558-559.

Visvesvara, G.S., Martínez A.J., Schuster, G.J., Wallace, S.V., Sawyer, T.K. & Anderson, M. 1990. Leptomyxid amoeba, a new agent of amoebic meningoencephalitis in humans and animals. J. of Clinical Microbiol. 28(12.): 2750-2756.

Wadowsky, R.M., Wilson, T.M., Kapp, N.J., West, A.J., Kuchta, J.M., States, S.J., Dowling, J.N. and Yee, R.B. 1991. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. App. and Environ. Microbiol. 57: 1950-1957.

Wang, S.S. & Feldman H.A. 1967. Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *N. Engl. J. Med.* 277: 1174-1179.

---

## APENDICE

---

### Medios de Cultivo

#### Agar No Nutritivo con *Escherichia coli* (NNE)

NaCl 0.12 g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.004 g  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.004 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.142 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.136 g  
Bactoagar 15.0 g  
Agua destilada 1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes. Agregar 500 ml de agua destilada y disolver, completar el volúmen de 1000 ml y hervir hasta que se disuelva bien el agar. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Se vacían 15/20 ml en cajas de Petri estériles (capa delgada). Cuando el agar haya solidificado se siembran 5 gotas de una suspensión concentrada en agua destilada de bacteria *Escherichia coli* muerta por calor a 70 °C por 30 minutos, extendiendo perfectamente la suspensión de bacterias por toda la caja.

Las cajas ya preparadas de esta manera se guardan en bolsas de plástico en el refrigerador.

### **Medio PBSGM (Chang Modificado) para cultivos axénicos**

Peptona Biotriptasa 16.6 g  
Dextrosa 2.7 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9 g  
Agua destilada 1000 ml

Los ingredientes se mezclan en seco y se disuelven en el agua destilada. Se envasan 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esterilizan a 121 °C por 15 minutos. Se guardan en el refrigerador hasta que vayan a ser utilizados.

Cuando se utilice el medio, los tubos se sacan del refrigerador y se ponen a temperatura ambiente, y se les agrega 0.3 ml de suero de bovino con antibióticos.

### **Preparación del suero de bovino para el medio PBSGM**

El suero se descongela y se pone en baño de agua a 56 °C durante 30 min para descomplementarlo. Ya descomplementado el suero, se prepara una mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica (laboratorios Lakeside) y Kanamicina (Bristol).

Penicilina G 1 000 000 U en 2 ml de H<sub>2</sub>O destilada  
Kanamicina 1 g en solución 3 ml  
Volúmen total 5 ml

Agregar 1.0 ml de la mezcla de antibióticos por cada 100 ml de suero descomplementado. Para obtener una concentración final de 200 mcg de cada antibiótico en 3.0 ml de medio PBSGM.

### **Medio modificado PYNFH**

#### **Solución 1**

Peptona Difco #3 10.0 g  
Extracto de levadura Difco 10.0 g  
Acido nucléico de levadura Sigma (almacenar a -20 °C) 1.0 g  
D-Glucosa 1.0 g  
Acido fólico 15 mg  
\* Solución de Hemina 0.5 ml

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.362 g  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 g  
Agua destilada a 900 ml

Si es necesario ajustar a pH de 6.9 y autoclavar a 121 °C por 15 minutos y almacenar a 4 °C.

#### Solución de Hemina

Hemina 200 mg  
Trietanolamina 100 ml  
Almacenar a 4 °C

#### Medio Completo

Solución I 900 ml  
Suero fetal de bovino 100 ml  
Penicilina (100 000 U/ml) 1 ml  
Estreptomicina (100 000 U/ml) 1ml  
Almacenar a 4 °C

#### FORMULACIONES DE MEDIOS Según Catalogue of Protists 17<sup>th</sup> edition 1991.

##### 354 Medio para *Acanthamoeba*

Proteosa peptona 15.0 g  
Glucosa 15.0 g  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 g  
Vitamina B<sub>12</sub> 1.0 mcg  
Biotina 200.0 mcg  
Tiamina 1.0 mg  
L-Metionina 14.9 mg  
Solución salina (ver abajo) 1.0 ml  
Agua destilada 1.0 L

Solución salina  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.15 g  
 $\text{FeCl}_3$  0.02 g  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.46 g  
Agua destilada 100.0 ml

Ajuste el pH a 5.5. El medio puede ser preparado libre de

partículas por filtración o centrifugación a alta velocidad previo a la esterilización en autoclave. Utilizar 5.0 ml por cada tubo de tapón de rosca de 16 X 125 mm.

**710 Medio de Nelson para *Naegleria***

**Solución de Page**

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.4 mg  
CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.4 mg  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.2 mg  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.6 mg  
NaCl 12.0 mg  
NaCl 12.0 mg  
Agua destilada 100.0 ml

A la solución anterior agregar:

Infusión de hígado (Oxoid o Panmede) 0.17 g  
Glucosa 0.17 g

Vaciar 4.5 ml en tubos con tapón de rosca de 16 X 125 mm. Esterilize en autoclave por 25 minutos a 121 °C. Enfríe y asépticamente agregue 0.5 ml de suero fetal por tubo (concentración final de 10 % de suero) antes de utilizar.

**711 PYb**

Proteosa peptona 1.0 g  
Extracto de levadura 1.0 g  
Agua destilada 900.0 ml

Prepare y esterilize separadamente cada una de las siguientes soluciones patrón y agregue al medio basal como se indica abajo para evitar precipitación (Prepare un volumen final de 1.0 L.)

**Soluciones patrón:**

0.05 M CaCl<sub>2</sub> 4.0 ml  
0.4 M MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 2.5 ml  
0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.0 ml  
0.25 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 32.0 ml

El pH deber de ser 6.5. Autoclave 25 minutos a 121 °C.

**902 Medio axénico de Schuster para *Naegleria***

Extracto de levadura 2.5 g  
Peptona 2.5 g  
Concentrado de hígado Oxoid al 5 %\* 100 ml  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.05 M) 60.0 ml  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.05 M) 40.0 ml  
Agua destilada cbp 1.0 L

Prepare el concentrado de hígado en agua destilada, filtre o centrifugue a alta velocidad para remover el sedimento y esterilize por autoclave. Agregue el concentrado de hígado filtrado al medio al momento de su preparación y autoclave el medio completo. Agregue suero de bovino antes de utilizar el medio.

**997 Medio para amebas de agua dulce**

Extracto de malta 0.1 g  
Extracto de levadura 0.1 g Bacto agar 10.0 g  
Agua destilada 1.0 L

**1029 Medio LIT**

Caldo infusión de hígado 9.0 g  
Tryptosa 5.0 g  
NaCl 1.0 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.0 g  
KCl 0.4 g  
Glucosa 1.0 g  
Suero fetal de bovino 100.0 ml  
Hemina 10.0 mg  
Agua destilada qbp 1.0 L

Ajuste el pH a 7.2 y esterilize por filtración Seitz. Vacíe aseptícamente en alcuotas de 5.0 ml en tubos de tapón de rosca de 16 X 125 mm.

**1152 Medio EG**

Acetato de sodio 1.0 g  
Extracto de carne 1.0 g  
Tryptona 2.0 g

Extracto de levadura 2.0 g  
CaCl<sub>2</sub> 0.01 g  
Agua destilada 1.0 L

Autoclave por 20 minutos a 121 °C

#### MITOSIS EN VIVO (en microcultivos)

Técnicas de microcultivo para la observación de la división celular en amebas

#### Material:

50.0 ml de bactoagar al 1.5 % recién esterilizado.

Papel celofán cortado en cuadros de 5 mm<sup>2</sup>.

Suspensión concentrada de bacteria *Escherichia coli* viva en agua destilada estéril.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Pinzas.

Parafina para histología.

Cámara húmeda.

#### Procedimiento:

Sobre una laminilla se deposita una capa delgada de bactoagar al 1.5 %.

Se hace una excavación en el agar de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>.

Se corta un fragmento de papel celofán y tomándolo con unas pinzas, se pone en contacto con la superficie de un cultivo de amebas en buen crecimiento pasando varias veces el celofán para capturar la mayor cantidad posible de amebas.

El fragmento de celofán se coloca sobre el cuadro de agar excavado con la parte impregnada de amebas hacia arriba.

Con una pipeta pasteur de toma una gota de la suspensión bacteriana y se coloca sobre un cubreobjetos y se voltea, de manera que la gota con bacteria quede colgando sobre el cubreobjetos, de esta manera se coloca sobre el trozo de celofán con amebas. Es importante hacer coincidir la gota con bacteria sobre la superficie de celofán con amebas.

Se sella la preparación con parafina refinada para histología y se guarda en cámaras húmedas a temperatura ambiente. Las

preparaciones se observan diariamente con objetivo de inmersión 100x.

### **TINCION TRICROMICA (Modificada por Cerva)**

#### **PROCESO DE FIJACION**

Se lava 1 caja con amebas en buen crecimiento con 5 ml de agua destilada.

Se hace el arrastre de este lavado de amebas con un asa acodada.

Se marcan los portaobjetos con un círculo de cera donde se va a poner el concentrado de amebas.

Con un bulbo unido a una pipeta Pasteur de punta alargada se toma el lavado de las cajas y se vacía en un tubo de ensaye con tapón de rosca. Centrifugar a 2 000 rpm durante 10 min.

Se desecha el sobrenadante y se toman 3 gotas de la pastilla que se ha sedimentado en el tubo para colocarlas en el portaobjetos ya marcado con la cera.

Se ponen los portaobjetos en camaras húmedas (cajas petri con agua destilada).

Estas camaras se incuban a la temperatura óptima a la que crece la ameba, durante 30 minutos con el objeto de que las amebas se adhieran al cristal. Ver al microscópio inmediatamente al sacarlas de la incubadora.

Se sumerge lo más pronto posible en el alcohol sublimado, debido a que las amebas se pueden separar del vidrio. Se mantiene la muestra sumergida de 1 a 2 horas (en este paso se lleva a cabo la coagulación de las protefnas).

Se hace el cambio de las muestras a alcohol al 80 %, y se deja durante toda la noche.

**NOTA:** Las preparaciones no se deben dejar secar.

Al día siguiente se hace un cambio a agua destilada para enjuagar.

#### **PROCESO DE TINCION**

La muestra se sumerge en hematoxilina por no más de 30 segundos.

Se enjuaga con agua alcalina. (Unas gotas de NaOH 0.1 N en agua destilada con el objeto de que la hematoxilina vire de rojo a azul).

Se enjuaga con agua de la llave abundantemente.

Se le pone la solución de Gómori (Mezcla Tricrómica) durante 10 minutos.

Se enjuaga rápidamente en la mezcla de solución ácido-acético-alcohol para quitar el exceso de solución de Gómori.

Se sumerge la muestra en etanol al 96 % 10 veces.

En otro recipiente con alcohol se vuelve a sumergir la muestra 10 veces (sacando y metiendo). Esto se hace con el objeto de deshidratar la preparación.

Finalmente se sumerge en el xilol duante 5 minutos.

### **ISOELECTROENFOQUE (IEF)**

#### **Buffers**

#### **Buffer de Acetato 0.05 M pH 5.0**

##### **Solución 1**

CH<sub>3</sub>COONa 1.64 g

Agua destilada 100 ml

##### **Solución 2**

CH<sub>3</sub>COOH 0.6 ml

Agua destilada 100 ml

Combinar 176 ml de la solución 1 y 74 ml de la solución 2 con 250 ml de agua destilada.

#### **Buffer Tris-maleato 0.2 M pH 6.0**

##### **Solución 1**

Tris 7.26 g

Acido maléico 6.96 g

Agua destilada 150 ml

##### **Solución 2**

NaOH 1.6 g

Agua destilada 100 ml

Combinar 125 ml de la solución 1 y 65 ml de la solución 2 con 310 ml de agua destilada.

**Buffer de fosfatos 0.1 M pH 5.7**

Solución 1  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.875 g  
Agua destilada 250 ml

Solución 2  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.83 g  
Agua destilada 100 ml

Combinar 230 ml de la solución 1 y 20 ml de la solución 2 con 250 ml de Agua destilada.

**Buffer Tris HCl 0.5 M pH 7.1**

Solución 1  
Tris 18.15 g  
Agua destilada 150 ml

Solución 2  
HCl 2.1 ml  
Agua destilada 250 ml

Combinar 125 ml de la solución 1 y 250 ml de la solución 2 con 125 ml de agua destilada.

**Revelado de Enzimas**

**Fosfatasa ácida (AP)**

Na- $\beta$ -naphthyl acid phosphate 100 mg  
Black K salt 100 mg  
Buffer de acetato 0.05 M pH 5.0 100 ml

**Leucin aminopeptidasa (LAP)**

$\beta$ -leucine-b-naphthylamide 40 mg  
Black K salt 50 mg  
Buffer Tris-maleate 0.2 M pH 6.0 100 ml

**Propionil esterasa (PE)**

Fast blue RR salt 100 mg  
Buffer de fosfatos 0.1 M pH 5.7 100 ml  
 $\alpha$ -naphthylpropionate al 1 % (en acetona al 50 %) 2 ml

**Malato deshidrogenasa (MDH)**

Na-L-malate 1 M 10 ml  
 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 50 mg  
Nitro blue tetrazolium (NBT) 30 mg  
Phenazine methasulphate (PMS) 2 mg  
NaCN 0.1 M 5 ml  
Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 7.1 15 ml  
H<sub>2</sub>O 70 ml

**Alcohol deshidrogenasa (AlcDH)**

Etanol (96 %) 3 ml  
 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 50 mg  
NBT 30 mg  
PMS 2 mg  
NaCN 0.1 M 5 ml  
Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 7.1 15 ml  
H<sub>2</sub>O 77 ml