



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

400282



61060

"APORTACION A LA TAXONOMIA DEL GENERO Hartmannella (PRTOZOA: LABOSEA, GYMNAMEOBIA)".

BO 1186/96
Ej. 1

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
GUILLERMO SUAREZ HERNANDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Dedicatoria

A mis padres y familia

Al Dr. Fermín Rivera Agüero por su dirección de este trabajo

Al profesor Arturo Calderón por su cooperación y apoyo.

Al personal del Proyecto CyMA.

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	11
Metodología.....	12
Resultados	18
Discusión	27
Conclusiones.....	31
Bibliografía	32

RESUMEN

Las amebas de vida libre del género *Hartmannella*, constituyen un grupo taxonómico poco estudiado. Sin embargo, han empezado a adquirir relevancia médica a partir de que se han relacionado con procesos patológicos en humanos como la meningoencefalitis, la queratitis y la bronconeumonía y como portadoras de la bacteria *Legionella pneumophila*, agente etiológico de la enfermedad denominada "de los legionarios". El presente trabajo documenta, el estudio morfológico y bioquímico de cuatro cepas de *Hartmannella vermiformis*, tres de referencia de un cepario internacional y una aislada del líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningoencefalitis y bronconeumonía, con el propósito de determinar su actual estado taxonómico. El estudio bioquímico permitió determinar la composición proteica y enzimática de tales cepas utilizando la técnica de isoelectroenfoque enzimático en agarosa en un rango de pH 3-10. Así, se determinó el patrón isoenzimático de las enzimas propionil-esterasa, fosfatasa ácida, fosfo-glucomutasa, leucín-amino-peptidasa, glucosa-fosfato-isomerasa y el bandeo de las proteínas totales de las cepas mencionadas crecidas monoxénicamente. Los zimogramas obtenidos sugieren una relación taxonómica cercana entre las cepas estudiadas, pues los patrones de bandeo fueron similares entre las cepas 1534/7A, 1534/7B y PT-1, esta última aislada de un paciente; con referencia a las enzimas fosfatasa ácida y propionil esterasa, y aunque se detectaron variaciones entre estas tres cepas y la cepa de referencia 1534/12, con relación a las mismas enzimas, la cepa 1534/12 mostró un bandeo idéntico al de las otras tres cepas con relación a la enzima leucín-amino-peptidasa. Las isoenzimas fosfo-gluco-mutasa y glucosa-fosfato-isomerasa sólo evidenciaron diferencias entre las cepas de referencia 1534/12 y 1534/7B. El análisis de proteínas totales muestra un patrón de bandas muy similar entre las 4 cepas amebianas contrastadas. La caracterización morfológica por microscopía electrónica mostro la presencia de finas microvellosidades parecidas a copas en la superficie celular de la PT-1, existentes solamente en el género *Hartmannella*. Aunque no se detectó una heterogeneidad bioquímica suficiente entre las cepas estudiadas de *Hartmannella vermiformis* como para separarlas en subespecies o en especies diferentes, los resultados obtenidos sugieren variaciones de los zimogramas de cada una de las cepas dentro de la misma especie.

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son organismos unicelulares asexuales cuyo tamaño oscila entre los 7 μm y los 70 μm . Se denominan amebas anfitoicas, término que describe la capacidad de vivir como dos formas de vida: como organismos de vida libre y como endoparásitos. Constituyen del 50 al 90 % de los protozoos heterótrofos en el suelo y se encuentran entre los más importantes depredadores de bacterias en dicho hábitat (Weekers y Van der Drift, 1993). Su hábitat natural es casi cualquier ambiente de la biósfera, en donde los medios contaminados con materia orgánica son la principal fuente de AVL potencialmente patógenas (Sawyer, 1989).

Además de estar ampliamente dispersas en el suelo, estas amebas colonizan exitosamente el agua y el aire, desde donde pueden invadir a los individuos que tengan contacto con ellas. También se le halla en el tracto digestivo de aves, mamíferos (John y Hoppe, 1990) y reptiles (Chamorro *et al.*, 1988). Estos organismos han sido aislados de una amplia variedad de fuentes: de las aguas termales naturales (Rivera *et al.*, 1989); de descargas de aguas termales contaminadas (De Jonckheere y Van De Voorde, 1976); de lagos (John y De Jonckheere, 1985; Deterline y Wilhem, 1991); de ríos, de plantas de tratamiento de aguas residuales (Rivera *et al.*, 1986); de sedimentos de estanques (Kyle y Noblet, 1986); y de aguas embotelladas (Fluvia *et al.*, 1983 a, b; Rivera *et al.*, 1981). También se han encontrado como "fauna normal" de la mucosa nasal (Rivera *et al.*, 1983; De Jonckheere y Michel, 1988; Meyeryan, 1991), así como en suelos agrícolas fertilizados con agua residual y basura orgánica, y en la arena de las playas (Sawyer, 1989). Ampliando lo que ya se dijo, las AVL también pueden hallarse suspendidas en el aire y en las gotas de la lluvia, en su forma quística (Rivera *et al.*, 1987; 1988; 1992; 1994); en muestras de polvo provenientes de hospitales, recámaras, comedores, cuartos de descanso, heces fecales de humanos, perros, ganado, y en áreas recreativas y deportivas no forestadas (Meyeryan, 1991)

Lo anterior demuestra la ubicuidad de las AVL, lo cual asociado a su potencial patógeno las hace posibles agentes causales para el hombre, de daños cerebrales, pulmonares, oculares e incluso de la muerte (Rivera *et al.*, 1992; 1994). En este sentido, el estudio de las amebas de vida libre ha demostrado que existe un grupo restringido de organismos que provocan infecciones en el hombre que ameritan una mayor consideración.

Los signos y los síntomas producidos por las AVL patógenas se agrupan en tres enfermedades bien definidas: La meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), causada por *Naegleria fowleri*; la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), provocada por *Acanthamoeba* spp., (en ambas enfermedades se afecta el sistema nervioso central) y la queratitis amebiana crónica, causada por *Acanthamoeba* spp.

La mayoría de los casos de la MEAP ocurren principalmente en individuos jóvenes con una historia previa de haber estado practicando actividades relacionadas con el agua (Stevens *et al.*, 1981; Wiley *et al.*, 1987; Visvesvara *et al.*, 1990; Gordon *et al.*, 1992; Fiordalasis, 1992). El padecimiento es de desenlace rápido y fatal (Rivera *et al.*, 1984). La mayoría de los casos de MEAP ocurren durante los meses de verano, cuando la temperatura ambiental es alta (Rivera *et al.*, op. cit.). Esta enfermedad ha sido reportada en países como Bélgica, República Checa, Gran Bretaña, Australia, Estados Unidos y México (Rivera *et al.*, op. cit.).

Por otro lado, la EAG es una infección oportunista que se presenta en individuos debilitados, diabéticos, y alcohólicos y en pacientes que han sido tratados con terapia inmunosupresiva prolongada (Martínez, 1991), así como en personas con sida o con algún otro compromiso del sistema inmunológico (Gordon *et al.*, 1992; Wiley *et al.*, 1987; Weldon-Linne, 1992).

La EAG también puede ser causada por otro tipo de amebas. Visvesvara *et al.* (1990) aislaron una ameba leptomixida del cerebro de un mandril con encefalitis, que era considerada como un organismo inocuo del suelo, a la que denominaron más tarde *Balamuthia mandrillaris*, advirtiendo sobre el potencial peligro de esta ameba como agente etiológico de meningoencefalitis en humanos. Recientemente, Gordon *et al.* (op. cit.) señalaron que el curso prolongado de la enfermedad y la presencia de granulomas en el cerebro y la piel del paciente, producidos por *Balamuthia mandrillaris*, son muy parecidos a los de la infección clásica de EAG producida por *Acanthamoeba* spp. En México, Jaramillo *et al.* (1989), informaron el primer caso de infección por *Balamuthia mandrillaris*, identificando lesiones necro-hemorrágicas en el encéfalo, el mesencéfalo, el puente y el bulbo.

A pesar de no conocerse la verdadera frecuencia de infecciones en humanos por las amebas de vida libre, se sabe con certeza de 200 casos de infecciones del sistema nervioso central (SNC) a nivel mundial causadas por dichos organismos. La mayoría de los casos se han debido a *N. fowleri*. Los restantes 56 casos han sido a causa de *Acanthamoeba* o de alguna otra AVL (Visvesvara y Stehr-Green, 1990).

La queratitis amebiana ha sido relacionada con los portadores de lentes de contacto, el empleo de soluciones salinas de limpieza preparadas en casa y la desinfección poco frecuente o inadecuada de las lentillas (Stehr-Green *et al.*, 1987). Se han reportado 250 casos de este padecimiento en Estados Unidos hasta julio de 1989 (Ma *et al.*, 1990).

El sistema taxonómico que describe con precisión el lugar que ocupan las principales familias de amebas dentro del grupo de los protozoos, se debe a Page (1988) y se muestra en el siguiente cuadro:

Reino Protista Haeckel, 1866	
Subreino Protozoa Goldfuss, 1818, emend Von Stebold, 1846.	
Phylum Sarcostigophora Honigberg & Balamuth, 1963.	
Subphylum Sarcodina Shmarda, 1871	
Superclase Rhizopodea Von Stebold, 1845	
Clase Lobosea Carpenter, 1861.	
Subclase Gymnamoebia Haeckel, 1862	
Orden Euamoebida Leps, 1960	
Familia Amoebidae Ehrenberg, 1838	
<i>Amoeba, Chaos, Polychaos, Trichamoeba</i>	Polipodiales, multinucleadas, con numerosos cristales citoplásmicos, glicocáliz delgado, capa filamentosos distintiva.
Familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931; emend Page, 1974	
<i>Hartmannella, Saccamoeba, Glaeseria, Cashia</i>	Monopodiales, formas flotantes casi siempre sin pseudópodos, uninucleadas, núcleo con nucléolo central, cristales citoplásmicos, glicocáliz delgado con elementos semejantes a copas.
Familia Vannellidae Bovee, 1979	
<i>Platyamoeba, Vannella</i>	Más o menos flabeladas, ovales o espatuladas, núcleo central, rara vez lóbulos nucleares parietales, glicocáliz diferenciado en discretos glicocostilos pentagonales.
Familia Vahlkampffidae Jollos, 1917	
<i>Vahlkampfia, Naegleria, Tetramitus</i>	Ameboides cilíndricas, en <i>Naegleria</i> temporalmente ramificado cuando no son activas; las amebas con varios filamentos uroidales formados por adhesión con tendencia a núcleos supernumerarios; las etapas flagelares formadas por la transformación de las amebas. Todas las <i>Vahlkampfias</i> de agua dulce/suelo forman quistes.
Familia Thecamoebidae Schaeffer, 1926; emend. Page, 1987	
<i>Thecamoeba, Dermamoeba, Sappinia</i>	Generalmente oblongas, con hialoplasma en media luna lateral, uninucleadas, sin cristales citoplásmicos, superficie cubierta con glicocáliz delgado, y pseudópodos amorfos hialinos (dactilópodos).
Familia Paramoebidae Poche, 1913; emend. Page, 1987	
<i>Daetylamoeba, Mayorella</i>	Subpseudópodos digitiformes o mamiliformes despuntados, uninucleadas, material nuclear en la porción central, superficie cubierta con microescamas o cutículas cubiertas en forma de bote.
Familia Vexilliferidae Page, 1987	
<i>Vexillifera</i>	Un subpseudópodo delgado y cónico surgido del hialoplasma anterior o de la superficie celular, forma flotante con pseudópodos finos, a menudo distribuidos asimétricamente, uninucleadas, con núcleo central, glicocáliz con glicocostilos.
Orden Leptomyxida Pussard y Pons, 1976; emend. Page, 1987	
Familia Flabellulidae Bovee, 1970	
<i>Paraflabellula</i>	Uninucleadas, subpseudópodos flabelados o espatulados, el margen anterior a menudo irregular, pseudópodos cónicos o redondeados.
Familia Leptomyxidae Pussard y Pons, 1976; emend. Page, 1987	
<i>Leptomyxa</i>	Uninucleadas, con tendencia a núcleos supernumerarios o a formar un microplasmodio multinucleado, formas cilíndricas y monopodiales, llegan a flabellarse o multilobularse, microplasmodio altamente ramificado y reticulado, subpseudópodo nunca anterior.
Orden Acanthopodida Page, 1976	
Familia Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975	
<i>Acanthamoeba, Protoacanthamoeba</i>	Subpseudópodo (acantópodo) prominente, delgado, flexible, ocasionalmente furcado con adelgazamiento progresivo o despuntado, uninucleadas, quistes con poros cerrados por opérculos, cuerpo semejante a centriolo.
Familia Echinamoebidae Page, 1975	
<i>Echinamoeba, Filamoeba</i>	Subpseudópodos finos, a veces furcados, más finos que en <i>Acanthamoeba</i> , en un género con tendencia a núcleos supernumerarios, quistes con o sin poros, sin cuerpo semejante a centriolo.

Von Rossenhof fue la primera persona en observar AVL en 1775. Los primeros estudios sobre amebas del género *Hartmannella*, datan de 1912, cuando Alexeieff describió la mitosis de las amebas limax (así llamadas por su forma al desplazarse, semejante al de una babosa) y estableció el género *Hartmannella*, empleando a *H. hyalina* Dangeard, 1900 como la especie tipo.

Castellanii en 1930 reportó amebas creciendo en cultivos de levadura, y en el mismo año, Douglas denominó a esta ameba *Hartmannella castellanii*. Un año más tarde Volkonsky describe varias amebas de vida libre y las agrupa dentro de tres géneros: *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Glaeseria*.

El trabajo taxonómico de Volkonsky fue cambiado por diversos investigadores llevando a una confusión. El género *Acanthamoeba* fue descrito en 1931 y el género *Hartmannella* en 1912; sin embargo, la literatura posterior a 1931, se refiere a las hartmanelas como pertenecientes al género *Amoeba*, denominándolas simplemente amebas limax (Ubelaker, 1991). Singh en 1952 separó a las entonces hartmanelas en dos grandes tipos de amebas, basándose en sus características de división nuclear y las incluyó en las familias Hartmannellidae y Vahlkampfiidae. Page (1966) redefinió los géneros *Hartmannella* Alexeieff, 1912 y *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931. El mismo Page (1967) restableció correctamente el género *Acanthamoeba*; sin embargo, hasta hace algunos años la literatura describía incorrectamente varias especies de *Hartmannella* como acantamebas generando más confusión entre los biólogos y los médicos. Los estudios de Page (op. cit) fueron fundamentales para la clasificación de tales amebas a las que llamó amebas anfihoicas.

Page (1988) continuó separando el género *Acanthamoeba* del género *Hartmannella* con base en su locomoción, formación de acantópodos y morfología del quiste. De esta forma, el género *Hartmannella* fue ubicado en la Clase Lobosea, Familia Hartmannellidae.

La familia Hartmannellidae es considerada como la que incluye a las amebas limax verdaderas, porque durante su locomoción estos protozoos son permanentemente monopodiales, excepto cuando cambian de dirección (Page, 1980; 1985). La longitud menor es generalmente de 7 µm; son uninucleadas con nucléolo central, presentan cristales tubulares mitocondriales y glicocáliz delgado con elementos discretos difíciles de observar pero semejantes a copas en la superficie celular (Page, 1985; 1988). Estas estructuras no se encuentran en organismos de los grupos Heterolobosea ni Leptomyxidae con los cuales existe una estrecha relación.

En general, *Hartmannella* casi siempre presenta una capa hialina durante la locomoción, forma quistes (en esta fase no se divide), y las mitocondrias son con frecuencia elongadas (Page, op. cit.).

La morfología de los trofozoítos del género *Hartmannella* ha sido estudiada mediante microscopía electrónica y de luz y los hallazgos se describen a continuación.

Page (op. cit.), encontró diferencias en la estructura de la superficie de dos especies marinas de hartmanelas. Así en *H. abertawensis* la forma flotante es irregularmente redondeada, con glicocáliz amorfo como penacho, sin elementos distintivos; sin inclusiones ópticamente activas; nunca se ha observado que produzca quistes y no tiene regiones amplias en el retículo endoplásmico rugoso. Mientras que *H. hibernica* se caracteriza a menudo por poseer una masa central, un glicocáliz por fuera de la membrana plasmática con filamentos agrupados hexagonalmente y mitocondrias envueltas en retículo endoplásmico rugoso.

El mismo autor (Page, op. cit.), describió las características ultraestructurales de varias hartmanelas: *H. cantabrigiensis* Page, 1974, exhibe un trofozoíto cuya longitud es de 23 μm , el quiste tiene un diámetro promedio de 8.8 μm , las estructuras de la superficie presentan un diámetro de 15-20 nm, el aparato de Golgi está constituido por 3 a 5 sacos, el retículo endoplásmico rugoso es alargado y con espacios abiertos, los quistes son lisos y ovoides con diámetro aproximado de 7 a 13 μm , y el proceso de exquistamiento es a través de un poro (Ariza *et al.*, 1991). Page y Blanton (1985) reportaron en una fotografía de microscopía electrónica la presencia de cristales tubulares ramificados en las mitocondrias.

En relación a *H. vermiformis* Page, 1967, la longitud varía de 12 a 13 μm ; el núcleo mide de 2.1 a 4.1 μm , no tiene lámina fibrosa interna y presenta un cuerpo cromatínico conspicuo entre el núcleo y la membrana nuclear; exhibe, asimismo, unos elementos superficiales de aproximadamente 12.5 nm de anchura y una altura de 6 nm, unas mitocondrias ovoides y alargadas de 1.1 μm de longitud y unos quistes de 6.9 μm que carecen de inclusiones ópticamente activas (Page, op. cit.). El proceso de exquistamiento es por la disolución de la pared quística (Ariza *et al.*, 1991) y la división nuclear es mesomitótica (Singh y Hanumaiah, 1979, citado por Weekers, 1993)

Una contribución de la biología molecular al estudio taxonómico de *Hartmannella* spp. fue realizado por Fields *et al.* (1990) quienes analizaron el patrón isoenzimático de tres cepas de *H. vermiformis*, demostrando que 5 de las 12 enzimas empleadas produjeron patrones de bandeos similares para las tres cepas. De acuerdo con estos autores dos cepas comparten una banda común en 10 de las 12 enzimas. Los mismos autores concluyeron que dos de las cepas derivan de un progenitor común y difieren en dos sistemas de enzimas, lo cual demuestra el grado de variabilidad dentro de la especie.

Weekers (op. cit.) ha reportado diferencias en los patrones isoenzimáticos de tres diferentes cepas axénicas y monoxénicas de *Hartmannella vermiformis* cuando las comparó con *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*.

Las diferencias entre *Acanthamoeba* y *Hartmannella* fueron muy evidentes en los corrimientos de la ADH (alcohol-deshidrogenasa), la GPI (glucosa-fosfato-isomerasa) y la FGM (fosfo-glucosa-mutasa). Estos resultados revelaron la ausencia de bandas típicas en el patrón isoenzimático de la FGM en las tres cepas de *Hartmannella* que crecieron monoxénicamente con *Pseudomonas fluorescens*. En algunos casos se observó la presencia de extrabandas en las cepas de *Hartmannella* con la FGM.

La contribución al estudio taxonómico comparado de *Hartmannella vermiformis* ha sido ampliada por Weekers *et al.* (1993) quienes reportaron la actividad bacteriolítica comparada de *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* y tres cepas de *Hartmannella vermiformis* sobre varias bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Las pruebas espectrofotométricas revelaron que las bacterias fácilmente lisadas fueron: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *C. vinosum*, *M. lacteus* y *P. fluorescens*, mientras que las bacterias difícilmente afectadas fueron: *S. marcescens* y *K. aerogenes*, en tanto que resultaron lisadas en varios grados: *A. simplex*, *A. tumefaciens* y *E. coli* K 12. La actividad bacteriolítica de las cepas de *Acanthamoeba* fue mayor que la de *Hartmannella vermiformis*, y las condiciones óptimas del proceso se dieron a un pH de 5-5.5 y a una temperatura de 40-55° C. El isoelectroenfoco en agarosa (IEFA) demostró que la actividad bacteriolítica de *Hartmannella* fue mas pronunciada en el rango del punto isoelectrónico (PI) de 4.0-9.3 mientras que el de *Acanthamoeba* lo fue en el de PI 4.5-8.9.

El mismo Weekers (op. cit.) desarrolló un procedimiento simple de cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* y *Hartmannella vermiformis* en un quimiostato, obteniendo un número de amebas de aproximadamente 2.5 y 3.2 X10⁶ por ml y un tiempo mínimo de generación de 25 y 16 horas, para *A. castellanii* y *H. vermiformis*, respectivamente; a una tensión de oxígeno del 90 %, evitando así la formación de quistes. La tasa de respiración durante el crecimiento fue de aproximadamente de 1.7 y 1.4 mmol/mg proteína X h, respectivamente.

Recientemente, Weekers y Van der Drift (1993) analizaron la actividad de varias enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno de dos diferentes cepas de *H. vermiformis* y dos especies de *Acanthamoeba*, demostrando la actividad enzimática específica en urato-oxidasa, glutamino-sintetasa, glutamato-oxalacetato-transaminasa, glutamato-piruvato transaminasa y glutamato-deshidrogenasa dependiente de NADh, por lo que dichas amebas utilizan una ruta catabólica similar a la de otros eucariontes. Weekers (op. cit.), ha señalado que la relación filogenética de *Hartmannella* es estrecha con *Acanthamoeba* y la microalga *Cryptomonas* sp., afirmando que el srRNA de *H. vermiformis* es de 1840 pares de bases y el contenido promedio de GC es de 48.59 % y que la secuencia intraespecífica varía en menos de 0.5 % entre las tres cepas de *Hartmannella* estudiadas, a pesar de que una es de Norteamérica y las otras de Europa.

Pérez *et al.* (1983) han descrito el patrón de bandeo de proteínas totales del género *Hartmannella* (*H. vermiformis*, *H. leptocnemus* y una especie no identificada, denominada *Hartmannella* sp.-1), empleando tres diferentes métodos en la preparación de las muestras, obteniendo un mayor número de bandas que oscilan entre 16 y 35 por el método de ultrasonido, con una similitud del 30.76 % entre *H. vermiformis* y *H. leptocnemus*, así como del 21.42% entre *H. vermiformis* y *H. sp-1* y del 23.25 % entre *H. sp.-1* y *H. leptocnemus*.

H. vermiformis es la especie más estudiada en otros aspectos, así, por ejemplo, Cerva *et al.* (1973) la aislaron de la mucosa nasal de personas sanas; Cerva y Hultdt (1974) identificaron amebas del género *Hartmannella* en piscinas. Kadlec (1978) aisló *H. vermiformis* de la tráquea y los bronquios de animales domésticos como el perro y el pavo; O'Dell (1979) las aisló del fondo de un lago y Kyle y Noblet (1986) de un estanque. También se han aislado de ríos (Ariza *et al.*, 1991), aguas minerales y minero-medicinales envasadas (Rivera *et al.*, 1981; Fluvia *et al.*, 1983; Fluvia, 1983). Por su parte, Batista *et al.* (1982) evaluaron la capacidad patógena de *H. vermiformis* DPG-1, detectando un grado de patogenicidad I, sin observar amebas en el cerebro, pero sí en la médula de tres ratones.

Por otro lado, la composición de la pared del quiste de *Hartmannella glebae* fue analizada por Updhyay *et al.* (1984), quienes encontraron que el 4.2 % de la pared total del quiste consiste de celulosa y 64 % de proteínas; el contenido de la glicina fue de 14.6 %, la valina, la serina y la treonina representaron más del 10% del total de aminoácidos; el contenido de carbohidratos en la pared fue de 8.2 %; el de lípidos totales 5 %; el de las cenizas 1.3 % y el del fósforo (como H_2PO_3) 0.08 %.

Existen otras especies: *Hartmannella hyalina* Dangeard, 1900, *Hartmannella agricola* Goodey, 1916 y *Hartmannella crumpae* Singh & Hanumaiah, 1979.

Por otro lado, se han descubierto nuevas cepas de *Hartmannella* asociadas a procesos patológicos en humanos. Recientemente, Centeno *et al.* (1995) han reportado el único caso de meningoencefalitis crónica asociado a amebas del género *Hartmannella*. Dicha *hartmanela* no mató a los ratones de experimentación que fueron inoculados intracerebralmente e intranasalmente con la cepa aislada del paciente, pero sí produjo una lesión inflamatoria crónica en el cerebro y los pulmones de ellos. El cuadro meningoencefálico del paciente fue de larga duración (más de dos meses) y mostró múltiples semejanzas clínicas e histopatológicas con la encefalitis producida por *Acanthamoeba* spp. Al ingresar al hospital los síntomas del paciente fueron: cefalea, rinorrea, rinoфаринgitis, náusea, vómito, hipotermia, hipertensión arterial y desnutrición grado I; en el hospital se presentaron síntomas como: estupor, alteración de conciencia, diplopia, pérdida de control de esfínteres, bradicardia, ptosis palpebral, papiledema, hipotonía muscular, arreflexia y rigidez del nuca, entre otros.

Las hartmanelas se pudieron aislar en grandes cantidades del líquido cefalorraquídeo del paciente -que recibió una excesiva terapia inmunosupresora-, pero como no se realizó la autopsia nunca se pudo determinar si las amebas se hallaban también en el tejido nervioso o en otros órganos como el hígado, los riñones, o los pulmones del paciente. Por todo ello, la hartmanela aislada (cepa PT-1) debe considerarse como un colonizador oportunista ya que no cubrió el requisito de matar a por lo menos el 40 % de los ratones inoculados por la vía intracerebral. Es posible que la infección se haya contraído al sumergir el paciente la cabeza en una pileta de agua contaminada por estos protozoos. El tratamiento incluyó dosis fuertes y prolongadas de antibióticos como la ampicilina, el cloranfenicol, la gentamicina y la estreptomycinina y de inmunosupresores que bien pudieron haber facilitado la invasión y la posterior diseminación y colonización de la *Hartmannella*. El paciente falleció pese a los esfuerzos terapéuticos realizados. Se descartaron virus y hongos y sólo en la primera muestra de líquido cefalorraquídeo se aislaron cocos Gram positivos.

En este sentido varios reportes publicados hasta la fecha señalan que algunas cepas del género *Hartmannella* son importantes agentes etiológicos de la enfermedad denominada de los legionarios, al proporcionar un medio ambiente intracelular a las bacterias de la especie *Legionella pneumophila*, que contaminan los sistemas de tubería de agua caliente (Wadowsky *et al.*, 1988; Breiman *et al.*, 1990; Fields *et al.*, 1990). Asimismo, ha sido posible aislarla directamente del medio ambiente, indicando la importancia en salud pública de tales organismos (Wadowsky *et al.*, 1991; Sanden *et al.*, 1992).

Por lo comentado, las hartmanelas han atraído la atención de los médicos sólo a partir del conocimiento de su asociación a procesos patógenos en los humanos, y es por ello que su estudio biológico ha empezado a adquirir importancia dentro de la investigación parasitológica médica. En este sentido y como se ha comentado, los estudios taxonómicos del género *Hartmannella* son escasos y se fundamentan principalmente en características morfológicas obtenidas tanto con la microscopía de luz como con la electrónica. Por ello resulta importante plantear un estudio taxonómico sobre las cepas pertenecientes a este género con el fin de confirmar o redefinir el estado taxonómico de dichas amebas.

Para este fin se cuenta en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la ENEP-IZTACALA con una cepa de *Hartmannella* aislada del paciente referido más arriba, y también con tres cepas de referencia internacionales: 1534/7A; 1534/7B y 1534/12, provenientes de la Culture Collection of Alge and Protozoa de Inglaterra (CCAP).

Este material biológico permitirá -utilizando las técnicas bioquímicas que se describen más adelante- aportar nuevos conocimientos sobre el estado taxonómico de este grupo de amebas tan poco conocido. Se han realizado intentos para resolver el problema de la identificación apropiada de las especies del género *Hartmannella*.

La evaluación electroforética de las proteínas y las enzimas se emplea frecuentemente en la elucidación de los patrones de relación y diferenciación genética a nivel de especie en algunos protozoos de difícil clasificación, como por ejemplo, algunas especies de *Trypanosoma africana* (Enyaru *et al.*, 1992), de *Giardia* (Proctor *et al.*, 1989) y de parásitos como *Entamoeba histolytica* (Mirelman *et al.*, 1986).

De este modo, la técnica de isoelectroenfoque en agarosa se ha convertido en una de las más empleadas para el estudio taxonómico de microorganismos a nivel molecular, por ser extremadamente flexible para separar y analizar proteínas, ácidos nucleicos y enzimas, logrando así, caracterizar cepas que desde el punto de vista morfológico pueden resultar muy parecidas o a veces idénticas (De Jonckheere, 1984).

OBJETIVOS

Objetivo General

Defenir y -en su caso redefinir- el estado taxonómico de las cepas de *Hartmannella* spp. procedentes de pacientes y de los ceparios internacionales, mediante la utilización de técnicas bioquímicas que permiten estudiar la composición proteica e isoenzimática de las cepas .

Objetivos particulares

Realizar los estudios de isoelectroenfoque enzimático en agarosa y de las proteínas totales de las cepas de *Hartmannella* spp. aisladas de pacientes y compararlas con las cepas de referencia.

Comparar los diagnósticos taxonómicos de las amebas del género *Hartmannella* spp. a nivel de especie, obtenidos mediante el estudio morfológico, con aquellos obtenidos mediante técnicas bioquímicas.

Organizar y sistematizar -en su caso- un nuevo esquema taxonómico de las amebas del género *Hartmannella* a partir de la información obtenida .

METODOLOGÍA

Se emplearon cultivos monoxénicos de cuatro cepas de *Hartmannella vermiformis* de las cuales tres son cepas de referencia (1534/7A Page 1964; 1534/7B Page 1974; 1534/12 Page 1964), todas provenientes del CCAP de Inglaterra, la 1534/7A aislada de un lago de agua dulce, Winconsin, Estados Unidos; la 1534/7B aislada del suelo, Cambridge, Inglaterra; la 1534/12 aislada de un río de agua dulce, Indiana, Estados Unidos; la cepa PT-1 aislada de un paciente y depositada en el cepario del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la ENEP-IZTACALA.

Para cultivarlas masivamente se prepararon los siguientes medios:

Preparación de la solución Ringer.

La composición de la solución Ringer corresponde a la descrita por Page (1988)

Solución de Page.

Bicarbonato de sodio 0.1 g. ; NaCl 6.0 g. ; KCl 0.075 g. ; CaCl 0.1 g. .

Se mezclaron y disolvieron todos los componentes en 500 ml de agua destilada; aforando la mezcla a 1000 ml y depositando 40 ml de la solución en botellas Roux (de un litro con tapón de algodón). Enseguida, se esterilizó en una autoclave a 121°C durante 15 minutos, y se almacenó en un cuarto frío a 4°C hasta su uso.

Medio agar no nutritivo con *Escherichia coli*: (NNE).

La composición y preparación del medio se da de acuerdo con De Jonckheere (1984)

NaCl	0.120 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.004 g
CaCl ₂ H ₂ O	0.004 g
Na ₂ HPO ₄	0.192 g
KH ₂ PO ₄	0.132 g.
Bactoagar	15 g.

Se mezclaron en seco todos los ingredientes y se disolvieron todos los componentes en 500 ml de agua destilada, aforando la mezcla a 1000 ml e hirviéndola hasta disolver totalmente el agar. Enseguida, se esterilizó en una autoclave a 121°C por 20 minutos. El medio se distribuyó en cajas Petri estériles (capa delgada), aguardando una hora hasta gelificar. Se adicionaron 5 gotas de una suspensión concentrada de agua destilada con *Enterobacter aerogenes* (en sustitución de *E.coli*) muerta por calor a 121°C a las placas de agar y se esperó 20 minutos; luego, se extendió la bacteria por toda la caja y se almacenó en un cuarto frío a 4°C hasta el tiempo de usarla.

Cultivos amebianos monoxénicos y mantenimiento de las cepas.

Cada cepa amebiana se mantuvo mediante pases seriados en 3 a 4 cajas con medio NNE a partir de la mejor caja de resiembra anterior. Se realizaron observaciones periódicas con un microscopio invertido (Zeiss) y se marcó la posición de las amebas y de los quistes con un marcador de tinta indeleble. Las áreas marcadas se extrajeron y se transfirieron (pequeños bloques de agar de 5 X 5 mm) a nuevas cajas con medio NNE. Dicho procedimiento se repitió cada 6 a 8 días. Las cajas de la penúltima resiembra se conservaron hasta comprobar el crecimiento de las amebas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Los cultivos fueron guardados en bolsas de plástico e incubados a temperatura ambiente.

Cultivo de las cepas.

Se empleó solución de Ringer para hacer crecer las amebas, agregándole 0.5 ml de suspensión de bacteria *E. aerogenes* -muerta a 65°C durante 30 minutos-, como fuente de alimento para las amebas en cada una de las botellas Roux que contenían 40 ml de la solución. Se transfirió cada una de las cepas crecidas durante 5 días a nuevas cajas con medio NNE, en condiciones asépticas. Posteriormente, las cajas se incubaron en posición horizontal a temperatura ambiente durante 4 a 5 días. Se realizaron observaciones diarias con el microscopio invertido (Zeiss) para comprobar el buen estado morfológico de las amebas y la ausencia de contaminación.

Concentración de los extractos.

Se cosecharon las cepas una vez que se alcanzó su máximo crecimiento poblacional en tubos de 50 ml y se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el concentrado en extracto se depositó en 0.1 ml de agua destilada estéril en tubos Ependorf. Luego, se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos, y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se congeló el concentrado a -70°C hasta su uso.

Isoelectroenfoque (IEF).

La preparación del gel de agarosa se hizo de acuerdo con De Jonckheere (1984).

Los criterios de selección de agarosa para la realización del IEF fueron los siguientes:

- a) La preparación del gel es fácil y segura.
- b) La preparación se tiñe y se destiñe con rapidez.

- c) No incluye químicos tóxicos.
- d) Permite registros permanentes de los geles, incluyendo los zimogramas.
- e) Ofrece la posibilidad de trabajos preparativos.

Se disolvieron 0.3 gr de agarosa (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden); 3.6 g. de sorbitol; y 27 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 50 ml en baño María hasta que la agarosa se disolviera totalmente.

Preparación del molde.

Se vertieron 2 ml de agua destilada a la mitad de la tabla de nivelación, colocada en posición horizontal; a continuación se colocó una película de plástico "gelbond" (Pharmacia) (114 X 225 mm) con la superficie hidrofílica externa a la superficie de la tabla de nivelación, asegurando de esta forma que la agarosa se adhiriera al lado hidrofílico, girando la placa de "gelbond" contra la tabla de nivelación, procurando eliminar las burbujas de aire y exceso de agua bajo el gel con papel absorbente. Enseguida, se colocó el molde de vaciado (111 X 225 mm X 1 mm) sobre la película plástica asegurando los bordes con "clips" .

Una vez disuelta la agarosa IEF y enfriada a temperatura ambiente hasta alcanzar los 75°C, se agregaron anfolitos (1.9 ml) con un gradiente de pH 3-10 (Pharmalyte, Pharmacia). Posteriormente, se vació la mezcla sobre todas las esquinas del molde, evitando la formación de burbujas de aire, aguardando de 10 a 15 minutos hasta que solidificara. Finalmente, se quitó el molde, tomando el gel y depositándolo en una toalla de papel húmedo, y almacenándolo a 4°C durante 24 horas.

Electroforesis

El IEF fue realizado en una unidad de electroforesis, aparato horizontal FB3000. Se empaparon tiras de electrodos (6 X 10 mm) en solución (NaOH) 1M (catódo) y H₂SO₄ 0.05M (ánodo), eliminando el exceso de líquido sobre el papel filtro, colocándolos a aproximadamente 1 mm del borde del gel.

Enseguida, se colocaron los extractos de amebas (10-20 microlitros) sobre aplicadores de papel filtro, a una distancia de 1 a 2 cm del ánodo. Se colocó enseguida la tapa del IEF sobre el aparato, comprobando que existiera un buen contacto.

El IEF fue realizado con una fuente de poder constante, ECPS 3000/150 con una transmisión máxima de corriente de 15 W y 1500 V durante 90 minutos; eliminando el papel filtro después de 45 minutos. Se suspende el proceso después de 45 minutos, quitando la tapa y las tiras de los electrodos. Durante el IEF, el gel fue enfriado con corriente de agua de grifo, con el propósito de que el calor generado por la fuente de poder no deshiciera el gel.

Revelado de las enzimas.

Se colocó el gel en los reveladores de enzimas fosfatasa-ácida (FA), leucín-aminopeptidasa (LAP), propionil-esterasa (PE), fosfo-glucomutasa (FGM) y glucosa-fosfato-isomerasa(GFI) por un periodo de 30 a 60 minutos, de acuerdo con Shaw y Prasad (1970) y De Jonckheere (1984) (Tabla 1).

Una vez que se completó el tiempo, el gel fue secado de la siguiente forma: se colocaron toallas de papel sobre el gel y enseguida una placa de vidrio y encima un peso de 1 kg. Después de 15 minutos, el gel se secó con una secadora de cabello.

Revelado de las proteínas totales.

Después de completar la electroforesis, el gel fue sumergido en ácido sulfasalícilico al 10% y ácido tricloro-acético al 10% durante 60 minutos. Posteriormente, se sumergió en solución destiñidora de metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:6) por 30 minutos. Enseguida, el gel se sumergió durante 180 minutos en azul de Coomassie R-250 al 0.2% (metanol: ácido acético: agua destilada en proporción 3:1:6). Luego, se destiñó el gel en solución destiñidora, descrita anteriormente, hasta obtener un fondo claro. Finalmente, el gel se seca con una secadora para cabello.

Microscopía.

La observación de la morfología de la cepa PT-1, comprendió el reporte de las diferentes formas tróficas (aplanada y limax) y quistes, a partir de cultivos monoxénicos, crecidos en placas NNE. Se extrajeron muestras y se realizaron observaciones a 40X con el microscopio de contraste de fases y se tomaron las medidas a 100 quistes (diámetro) y de 100 trofozoítos (longitud, anchura y diámetro de núcleo), de la fase limax, en virtud del polimorfismo de esta ameba. De las preparaciones se obtuvieron fotografías a 800X y 1000X en contraste de fases.

Microscopía electrónica de transmisión.

Se concentraron cultivos en máximo crecimiento poblacional de trofozoítos y quistes de la PT-1 en solución de Ringer, centrifugando a 2500 r.p.m. durante 15 minutos, y se desechó el sobrenadante, el concentrado se depositó en tubos Ependorf en 0.5 ml de "buffer" de cacodilato y glutaraldehído al 4 % pH 7.1. Posteriormente los concentrados se procesaron por el método básico para microscopía electrónica de transmisión. Obteniendo el registro fotográfico de las preparaciones.

Tabla 1

Reveladores de enzimas.

Fosfatasa ácida (AP).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Na - β -naftil -ácido fosfato	100 mg
Sal Negra K	100 mg
Acetato amortiguador 0.05 M pH 5.....	100 ml

Leucín-amino-peptidasa (LAP)

β -Leucín - β -naftilamida	40 mg
Sal Negra K	50 mg
Tris-malato 0.2 M amortiguador pH 6.0 .	100 ml

Propionil-esterasa (PE)

Azul rápido RR sal	100 mg .
Fosfato 0.1 M amortiguador pH 5.7	100 ml
1 % α naphti-propionato (en acetona al 50 %)	2 ml.

Fosfoglucomutasa (FGM)

Na ₂ - α -D-glucosa-1-fosfato-4 H ₂ O	60 mg
NADP.....	10 mg
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	80 unidades
NBT.....	20 mg
PMS.....	1 mg
MgCl ₂	80 mg
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1	10 ml
Agua destilada.....	70 ml

Glucosa-fosfato-isomerasa (GFI)

D-fructosa-6-fosfato	160 mg
NADP.....	10 mg
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	80 unidades
NBT.....	10 mg
PMS	1 mg
MgCl ₂	80mg
Tris-HCl 0.1 M pH 8.1	15 ml

AMORTIGUADORES

Acetato 0.05M amortiguador pH 5.0

Solución 1

CH ₃ COONa.....	1.64 g.
Agua destilada.....	200 ml.

Solución 2

CH ₃ COOH	0.6 ml.
Agua destilada.....	100 ml.

Se mezclaron 176 ml de la solución 1 y 74 ml de la solución 2 en 250 ml de agua destilada.

Tris-malato 0.2 M amortiguador pH 6.0.

Solución 1.

Tris	7.26
Ácido málico	6.96 g.
Agua destilada.....	150 ml.

Solución 2

NaOH	1.6 g.
Agua destilada.....	100 ml

Se mezclaron 125 ml de la solución 1 y 60 ml de la solución 2 en 310 ml de agua destilada

Fosfato 0.1M amortiguador pH 5.7.

Solución 1.

NaH ₂ PO ₄	6.875 g.
Agua destilada.....	250 ml.

Solución 2.

NaHPO ₄	3.415 g.
Agua destilada.....	50 ml.

Se mezclaron 230 ml de la solución 1 y 20 ml de la solución 2 en 250 ml en agua destilada.

Tris-HCl 0.5 M amortiguador pH 7.1.

Solución 1.

Tris.	18.15 g.
Agua destilada.....	150 ml.

Solución 2

HCl	2.1 ml.
Agua destilada.....	250 ml.

Se mezclaron 125 ml de la solución 1 y 250 ml de la solución 2 en 125 ml de agua destilada.

RESULTADOS.

La representación diagramática del patrón isoenzimático de la enzima leucín-amino-peptidasa (Fig.1) en el gradiente de pH 3-10, muestra que los extractos de la misma especie, después de dos años y medio de continuos cultivos monoxénicos no mostraron profundas diferencias en el patrón general isoenzimático. El zimograma muestra una homogeneidad bioquímica en todas las cepas examinadas, conformándose un patrón de tres bandas intensas que cubre un amplio rango de pH, desde la zona ácida hasta la zona alcalina. Asimismo, se observa una banda anodal muy intensa en la cepa 1534/12 y una extrabanda muy tenue en la cepa 1534/7A, en la región media entre el ánodo y el cátodo. Sin embargo, las similitudes en el zimograma, son extraordinarias, compartiéndose el mismo número y movilidad de las bandas en los extractos de las cepas estudiadas.

El zimograma, para el patrón de bandeo de la enzima fosfo-gluco-mutasa se muestra en la Fig. 2. Las bandas de FGM de todas las cepas se localizaron aproximadamente en la misma zona catódica o alcalina. Se obtuvieron algunas diferencias en el patrón de bandeo de las cepas 1534/12 y 1534/7B con una y dos bandas respectivamente. El zimograma de la cepa 1534/12 mostró una banda de intensidad tenue y ligeramente en posición inferior. Los extractos de las cepas 1534/12, 1534/7A y PT-1 mostraron una banda casi equidistante en la zona media del zimograma. Esta enzima distingue, particularmente, a la cepa 1543/7B, caracterizada por la presencia de dos bandas muy próximas. El resto de los extractos celulares exhibieron un patrón de bandeo único, pero de movilidad distinta.

Fosfatasa ácida (FA). Con relación a esta enzima, las cepas 1534/12 y PT-1 fueron claramente distinguibles. La cepa 1534/12 con dos bandas en posición extrema, una anódica y otra catódica. Los extractos celulares de la cepa PT-1 mostraron tres bandas, dos en la región del cátodo y una de menor intensidad próxima a la zona del ánodo, compartiendo la misma posición con las cepas 1534/7A y 1534/7B. Estas últimas caracterizadas por la presencia de cuatro bandas en idéntica posición (Fig. 3), y compartiendo dos bandas de menor intensidad cerca una de la otra, en la región media ácida y dos muy intensas en la región alcalina.

La enzima propionil esterasa (PE) distinguió cuantitativamente a la cepa de referencia 1534/12 del resto de las cepas al presentar una sola banda en la zona ácida del pH. La comparación de extractos de la cepa PT-1 reveló la presencia de seis bandas, tres muy intensas y tres débilmente marcadas. Cinco de las seis bandas fueron idénticas a las de la cepa 1534/7B, a excepción de una banda muy tenue que no se expresó en esta última, no dejando duda que se trata de la misma especie. La cepa 1534/7B mostró cinco bandas, tres muy marcadas y dos tenuemente reveladas y cuatro localizadas en la zona anodal.

La cepa 1534/7A compartió tres bandas con las cepas 1534/7B y PT-1, en donde estuvieron ausentes las bandas menos intensas. Estas tres cepas, constituyeron un grupo muy homogéneo, a juzgar por la observación del zimograma (Fig. 4). Estas observaciones pueden ser complementadas por la coincidencia cualitativa indicada por la intensidad de la coloración de las bandas.

El zimograma de la glucosa-fosfato-isomerasa (GFI) (Fig. 5) detectó un patrón isoenzimático de una sola banda en tres de las cuatro cepas: 1543/7A, 1534/7B y PT-1, así como una similitud en el patrón de bandeo de la cepa PT-1 y 1534/7A, localizándose una sola banda en la zona media del zimograma. La cepa 1534/7B también mostró una banda, pero en posición diferente. Los concentrados celulares de la cepa de referencia 1534/12 presentaron tres bandas, dos próximas en la región media del gradiente de pH, casi en la misma posición que el resto de las cepas, y una banda en la zona anódica, como la observada en los zimogramas de PE, LAP y FA.

En la Fig. 6 se observan el patrón de bandeo de proteínas totales de los extractos celulares, de las cepas estudiadas, producidas en un gradiente de pH de 3-10. El patrón de bandeo entre las cepas, mostró extraordinarias similitudes, a pesar de que las bandas obtenidas en la cepa de referencia 1534/7B, resultaron de menor intensidad, lo que sugiere que las proteínas produjeron bandas en la misma posición independientemente de la concentración de los extractos. Los lisados de las cepas analizadas, revelaron suficientes patrones característicos, entre los más importantes: una banda densa anódica, menos tenue en la cepa 1534/7B; cuatro o cinco bandas comprendidas en la zona media del gel y dos bandas en la zona del ánodo, casi imperceptibles en los extractos celulares de la cepa de referencia 1534/7B.

Las observaciones de morfología mostraron amebas de forma, limax (Fig. 8b), en estado de quiste (Fig. 8a) y de forma aplanada (Fig. 7). El trofozoito en la forma limax es uninucleado, con un núcleo grande y definido, con cromatina localizada alrededor de un nucléolo prominente. En los quistes (Fig. 9), se observa la presencia de cuerpos conspicuos de cromatina extranuclear entre la membrana nuclear y el nucléolo. La cromatina se condensa sobre la pared del núcleo. Durante el movimiento no muy típico el pseudópodo de avance es grueso y eruptivo en forma de lobópodo, mostrando dos pequeños pseudópodos hialinos (Fig. 7). La forma limax cambia a forma aplanada cuando existen condiciones óptimas de nutrición. Este lobópodo se adelgaza hacia el frente, manteniéndose la forma limax y el segmento posterior se mantiene más estrecho que el resto de la ameba, el cambio de dirección ocurre con la formación de otro pseudópodo en la zona anterior (Fig. 7).

La media promedio de 100 trofozoitos y 100 quistes de la cepa PT-1 se muestra a continuación.

Longitud.....	16.45 μm intervalo 14.1 a 18.8 μm
Anchura.....	5.66 μm intervalo 4.7 a 7.05 μm
Núcleo.....	4.08 μm intervalo 3.9 a 4.4 μm
Nuécleolo.....	2.14 μm intervalo 1.98 a 2.4 μm
Quiste.....	10.22 μm intervalo 7.71 a 12.85 μm

La microscopía electrónica no evidenció la presencia de bacterias endocíticas en la ameba PT-1. La figura 10 muestra mitocondrias elípticas u ovales, las crestas mitocondriales son

de forma tubular; sin aparato de golgi; la membrana celular con microvellosidades de formas parecidas a copas o ventosas.

Los quistes son redondos y ovoides sin poros, dependiendo de las diferentes fases de maduración del proceso de enquistamiento. La fase más temprana de formación se llama prequiste, observándose las vacuolas y el núcleo, típicas del trofozoíto. El quiste maduro es redondo con una capa mucilaginosa externa, sin poros, con un núcleo rodeado de cromatina (Fig. 9). El quiste ovoide (Fig. 9), muestra dos capas; la capa externa de aspecto membranoso con ondulaciones cercana a la capa interna.

Leucin amino peptidasa (LAP)
pH3-10

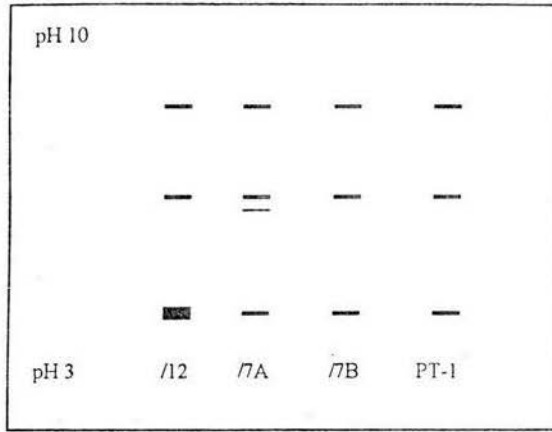


Figura 1. Patrón isoenzimático de la cepa PT-1 y de las cepas de referencia obtenidas por AIEF

Fosfoglucomutasa (FGM)
pH3-10

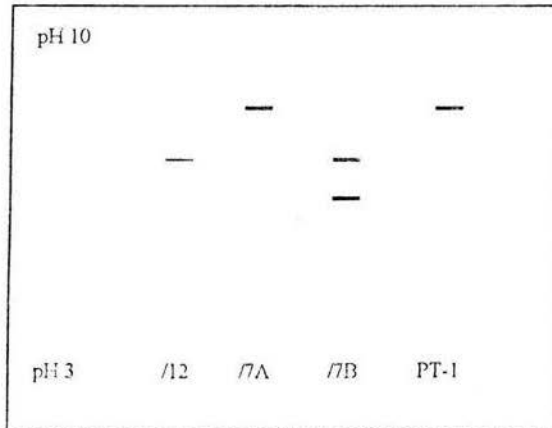


Figura 2. Patrón isoenzimático de la cepa PT-1 y de las cepas de referencia obtenidas por AIEF

Fosfatasa Acida (FA)
pH3-10

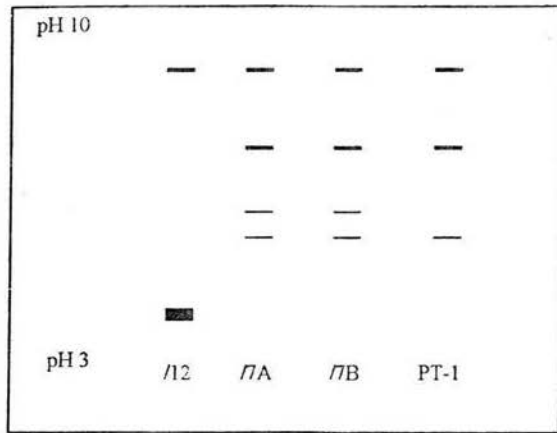


Figura 3. Patrón isoenzimático de la cepa PT-1 y de las cepas de referencia obtenidas por AIEF

Propionil Esterasa (PE)
pH3-10

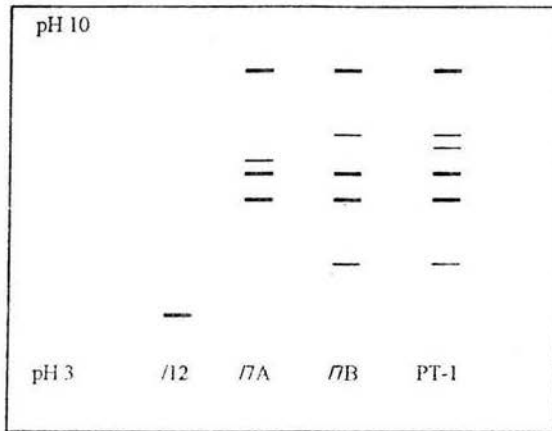


Figura 4. Patrón isoenzimático de la cepa PT-1 y de las cepas de referencia obtenidas por AIEF

Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI)
pH3-10

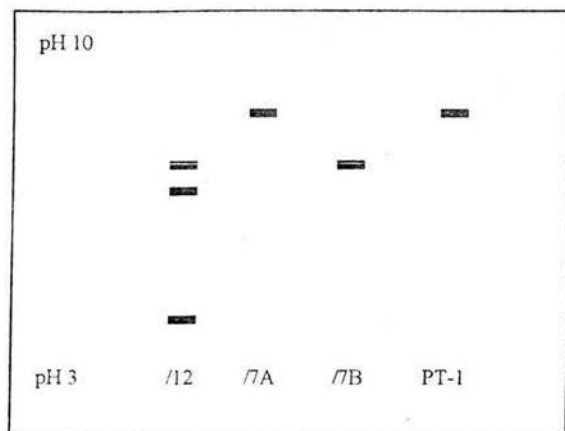


Figura 5. Patrón isoenzimático de la cepa PT-1 y de las cepas de referencia obtenidas por AHF

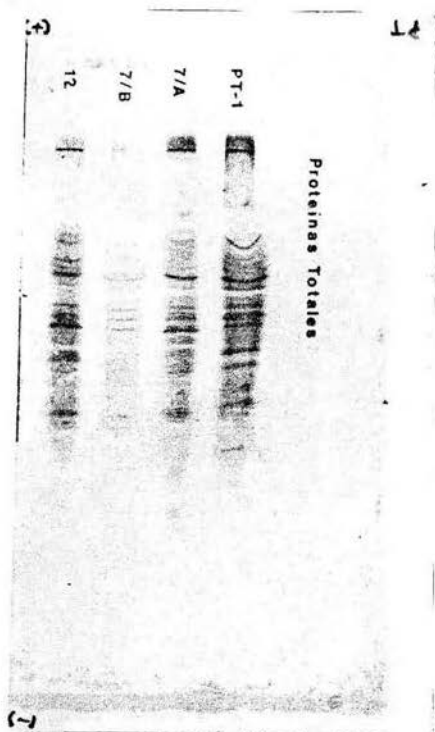


Figura 6. Se muestra el patrón comparativo de bandas obtenidas para proteínas totales de las cepas de *Hartmannella*, 7A, 7B, 12 y PT-1

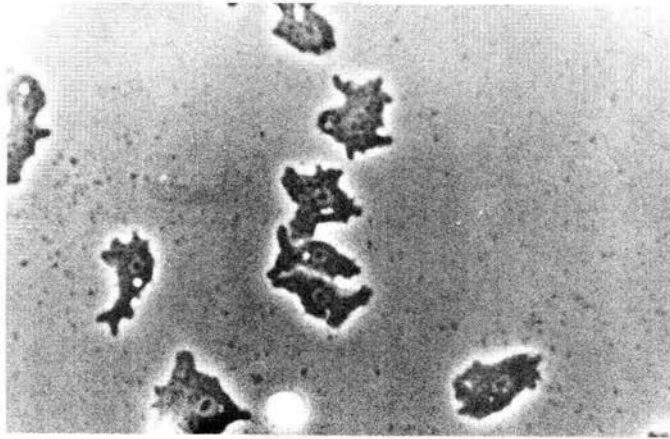


Fig. 7 Fotomicrografía de contraste de fases de la cepa PT-1 mostrando la forma aplanada. Se pueden apreciar algunos trofozoitos alimentándose (800x).

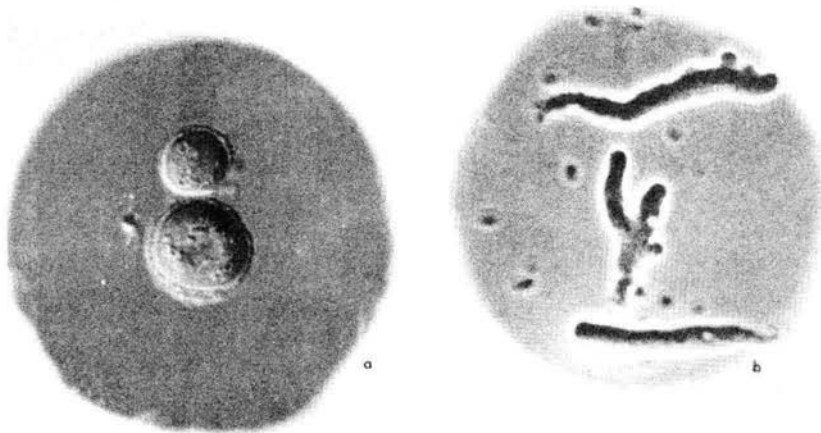


Fig. 8. En la fotografía a se observan quistes maduros de la cepa PT-1 aislada, mostrando una capa mucilaginosa y sin poros (1260x). En la fotografía b se aprecian trofozoitos de la misma cepa en forma "limax" alimentándose en forma activa (800x). Ambas fotografías están tomadas en contraste de fases.

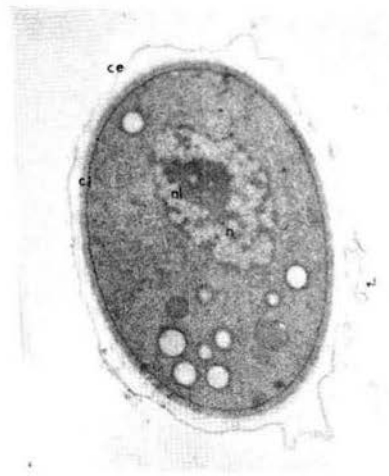


Fig. 9 Electromicrografía del corte de un quiste ovoide de la cepa PT-1. Se observa la capa externa (ce), capa interna (ci), núcleo (n) con cuerpos condensados de cromatina extranuclear y nucleólo (nl) (1200x).



Fig. 10 Fotomicrografía al microscopio electrónico de transmisión del trofozoito de la cepa PT-1. Se muestran microvellosidades (mv) parecidas a "copas" en la superficie celular; el núcleo (n); el nucleólo (nl); vacuóla digestiva (v) y mitocondrias (m) con crestas tubulares (5 800x).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron tres cepas de referencia de *Hartmannella vermiformis*, aisladas del ambiente, y una cepa aislada de un paciente con una infección crónica de meningoencefalitis y bronconeumonía. Las cepas se analizaron a través de su perfil isoenzimático y proteínas totales empleando la técnica de isoelectroenfoque en agarosa (IEFA).

El análisis isoenzimático de las cinco enzimas empleadas puede considerarse como una técnica muy útil durante la caracterización e identificación de una cepa a nivel de especie. La técnica de IEFA expresa ciertamente la singularidad del zimograma de la especie *H. vermiformis*; asimismo, el método permite reconocer relaciones taxonómicas de especies provenientes de regiones geográficamente diferentes.

Los extractos celulares de las cepas estudiadas y reveladas sobre un gel de anfólitos con valores de pH 3-10, demostraron que los zimogramas obtenidos por isoelectroenfoque, registraron una similitud idéntica en el patrón de bandeo entre las cepas 1534/7A y PT-1 para los sistemas enzimáticos glucosa-fosfato-isomerasa (GPI) y fosfo-gluco-mutasa (PGM) con una sola banda, a pesar de que la cepa PT-1 fue aislada del líquido cefalorraquídeo de un paciente, mientras que la cepa 1534/7A se aisló en 1964 por Page de un lago de Wisconsin, Estados Unidos. Esto indica que dentro de la especie *H. vermiformis* existen diferentes zimogramas: así, las cepas 1534/12 y 1534/7B exhibieron patrones de bandeo diferentes a los extractos de las cepas 1534/7A y PT-1, como se observa en las Figuras 2 y 5. Como se muestra en la Fig. 5, el número de bandas revelado para la enzima GPI osciló de una a tres, es decir, únicamente la cepa 1534/12 mostró un bandeo múltiple. Tales resultados contrastan con los obtenidos por Weekers (1993), quien ha reportado una ausencia total de bandas en cepas de *H. vermiformis* crecidas monoxénicamente con *E. coli* K12 y *P. fluorescens*. Sin embargo, las mismas cepas crecidas en condiciones axénicas mostraron un patrón múltiple de bandeo, utilizando el ensayo con la enzima GPI.

Por otro lado, el patrón isoenzimático de FGM examinado demostró que tres cepas presentaron una banda y la cepa 1534/7B dos bandas (Fig. 2). Algunos estudios similares realizados por Weekers (1993) en el sistema enzimático de FGM denotaron la ausencia total de bandas de tres cepas de *H. vermiformis* crecidas monoxénicamente con *E. coli* K12 y *P. fluorescens*, mientras que los lisados de las mismas cepas obtenidos en condiciones axénicas mostraron un patrón múltiple de bandeo.

Dicha aseveración se confirma plenamente al observar la similitud en el bandeo del zimograma de la enzima PE, al compartir la cepa PT-1, 5 de las 6 bandas con la cepa de referencia 1534/7B. La cepa 1534/7B conforma un perfil de bandeo casi similar al obtenido con los concentrados celulares de la cepa 1534/7A, coincidiendo en 3 de las 5 bandas. Este sistema enzimático reveló que tres de las cuatro cepas (1534/7A, 1534/7B y PT-1) exhiben un comportamiento de múltiple bandeo. De la misma manera, el sistema enzimático FA separó en cuatro bandas los extractos celulares de las cepas 1534/7B y

1534/7A. Es importante señalar que la cepa PT-1, coincide en el perfil de bandeo con la cepa de referencia 1534/7B y 1534/7A en tres de las cuatro bandas. Estas observaciones difieren de los hallazgos de Weekers (1993), quien con la *H. vermiformis* alimentada con la bacteria *E. coli* K12 encontró ausencia de bandas; sin embargo, esta misma cepa cultivada con *P. fluorescens* desarrolló un múltiple bandeo, similar al obtenido en el presente trabajo. Probablemente porque en el primer caso la bacteria es más fácilmente lisada que *P. fluorescens*.

En relación con el análisis enzimático de la FA, la cepa 1534/12 mostró un patrón de bandeo distinto al resto de las cepas analizadas. El zimograma obtenido de los trofozoítos aislados del paciente (cepa PT-1) fue casi similar al de las cepas 1534/7A y 1534/7B. Hay que recordar que esta última cepa de referencia se aisló de una hojarasca en Wandlebury, cerca de Cambridge, Inglaterra y, sin embargo, comparte con la cepa aislada del paciente cuatro bandas.

Por otro lado, el patrón isoenzimático registrado en el zimograma de la LAP mostró una homogeneidad bioquímica en todas las cepas examinadas, con tres bandas distribuidas a lo largo del gel, y con una banda extra en la cepa 1534/7B.

De los concentrados celulares de la cepa 1543/12 revelados en los 5 sistemas enzimáticos empleados, sólo el de la enzima LAP coincidió en la cantidad y movilidad de las bandas con el resto de las cepas estudiadas. Comúnmente se registra una banda anódica en los sistemas enzimáticos de la PE y la FGM y un máximo de tres bandas en los zimogramas de las enzimas LAP y GPI, y un patrón de dos bandas para la enzima FA. Los resultados obtenidos en el zimograma de la FGM no coinciden con las observaciones realizadas por Weekers (1993) quien reporta la ausencia de bandas en los corrimientos de las enzimas FGM y FA con extractos de hartmanelas crecidas monoxénicamente. Así por ejemplo, la cepa *H. vermiformis* OS-101 mostró una actividad típica crecida en *E. coli*, variedad K12. Asimismo, las tres cepas de *H. vermiformis* obtenidas de lisados axénicos revelaron bandas extremadamente intensas cuando se analizó la misma enzima.

La diferencia y la similitud en el patrón de bandeo en número y posición entre diferentes cepas de la misma especie no son inesperadas. De Jonckheere (1982a) sugiere que las cepas aisladas del mismo lugar y en la misma fecha, pueden mostrar diferentes zimogramas y que las cepas aisladas de lugares geográficamente separados pueden exhibir bandas idénticas para casi todas las enzimas.

Nerad y Daggett (1979) reportan que el análisis del IEF en las cepas de *Naegleria* empleando las enzimas FA, LAP y PE es suficiente para separar cepas patógenas y no patógenas. En este caso el área geográfica de aislamiento no parece reflejarse en los zimogramas. La misma conclusión obtienen Daggett y Nerad (1983) al separar muestras de *N. gruberi* y *Paratetramitus jugosus*, provenientes de Estados Unidos e Inglaterra y de Bélgica y Escocia, respectivamente.

Proctor *et al.* (1989) reportaron que las cepas aisladas de *Giardia duodenalis*, obtenidas de áreas geográficas diversas y hospederos diferentes, presentan patrones isoenzimáticos muy similares. Es posible que esta explicación pueda aplicarse en el caso de las cepas 1534/7A; 1534/7B y PT-1.

Las diferencias en el patrón de bandeo señaladas, pueden explicarse como resultado de diferencias en el estado fisiológico o pueden deberse a las condiciones de cultivo (Weekers, 1993).

Las diferencias en el patrón isoenzimático dentro de una especie también han sido reportadas anteriormente; por ejemplo, en *Acanthamoeba mauritaniensis* las tres cepas de referencia muestran variaciones excepto en el zimograma de la malato-deshidrogenasa (MDH); *Acanthamoeba quina* tiene un patrón de bandeo diferente para la FA y, por consiguiente, se mantiene su nombre para cepas no patógenas. En el grupo *Acanthamoeba lugdunensis-Acanthamoeba quina* se han observado varias diferencias isoenzimáticas para la PE (De Jonckheere, 1983). Moss *et al.* (1988) observaron variaciones en los perfiles enzimáticos de las enzimas GPI, GDH, SOD y MDH, en cepas de *Naegleria*, que fueron atribuidas al grado de heterocigosis dialélica en los loci genéticos que codifican estas enzimas. Pernin *et al.* (1985) demostraron similitudes y divergencias entre las cepas de *Naegleria*, empleando enzimas como la super-oxidasa-dismutasa (SOD), la FA, la enzima málica (EM), y la LEA. La interpretación de estos resultados sugiere la existencia de dos grupos filogenéticos en el género *Naegleria*.

El análisis enzimático en la identificación de las amebas debe ser empleado con precaución cuando existen condiciones diferentes de cultivo (Weekers, 1993) ya que los patrones isoenzimáticos de especies de *Hartmannella* y *Acanthamoeba* crecidas monoxénicamente y axénicamente, revelan diferencias en los zimogramas, incluso dentro de la especie *Hartmannella vermiformis*.

Mirelman *et al.* (1986) reportaron que durante la axenización de los trofozoítos de *E. histolytica* se observaron cambios graduales en las propiedades de virulencia, así como cambios en los patrones isoenzimáticos, de la hexoquinasa y fosfo-gluco-mutasa, después de transferirlos a medio TY1-5-33. Dichos autores concluyeron que las condiciones del medio de crecimiento pueden causar la selección de subpoblaciones de trofozoítos con diferentes propiedades como virulencia y zimogramas.

Tilgner y Michejda (1978) reportaron ligeros cambios en el patrón electroforético en una de las dos bandas producidas en la enzima LDH (lactato-deshidrogenasa) dependiendo de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, la movilidad de la banda LDH fue idéntica en los cultivos nitrogenados y oxigenados de 10 días, mientras que la movilidad de la banda disminuía de acuerdo con la presencia de la fitohemaglutinina B en cultivos de 10 días, pero no en cultivos de mayor tiempo. Además, observó una mayor restricción de la movilidad en presencia de citrato y acetato en los cultivos. La información electroforética indica que en la mayoría de los casos la disminución del oxígeno disminuye la movilidad de la banda anódica de la enzima LDH e incrementa la intensidad de la banda catódica. Estos

últimos resultados probablemente expliquen el comportamiento de las cepas de referencia 1543/12 para las enzimas LAP, FA, PE y GPI (Fig. 1, 3, 4 y 5) y los extractos celulares de las cepas 1534//B, 1534/7A y PT-1 en el sistema enzimático LAP (Fig. 1). Band y Kopachik (1991) estudiaron la síntesis de proteínas en *N. fowleri*, relacionadas con la virulencia, encontrando que después de seis meses en cultivo axénico, el patrón de la síntesis de las proteínas en las cepas patógenas cambió y, por consiguiente, la virulencia.

El análisis de proteínas totales no evidenció diferencias notables en el patrón de bandeo en los lisados de las cepas estudiadas, mostrando un comportamiento de bandeo relativamente homogéneo, indicando una composición proteica bastante estable, a pesar de las fechas de aislamiento y la procedencia de las cepas. Por lo tanto, puede afirmarse que las cepas estudiadas pertenecen todas a la especie *Hartmannella vermiformis*.

La descripción a nivel de morfología y locomoción de la PT-1, permite ubicarla dentro de la Familia Hartmannellidae. La ultraestructura, demuestra la presencia de estructuras semejantes a "copas" sobre la superficie celular, la cual es distintivo en la familia (Page, 1998); así, como mitocondrias ovales y alargadas con crestas tubulares. El quiste ovoide o redondo carece de poros, con cuerpos conspicuos de cromatina extranuclear condensada sobre la pared del núcleo, propiedad observada únicamente en quistes, semejantes al de *H. vermiformis* cepa 1534/7A. Los quistes presentan un exoquiste y un endoquiste, con una capa mucilaginosa ondulante y estrecha más hacia el quiste, esta capa aparece también en *H. cantabrigiensis* (Page, op. cit.).

La cepa PT-1 muestra un patrón de locomoción típico de las cepas de referencia en *Hartmannella*, de forma limax (alargada), desplazamiento rápido por la formación de lobópodos, llegando en esta fase hasta 36 μm ; cuando existen condiciones favorables de alimentación, la ameba adquiere una forma algo redonda que mide 23 μm .

CONCLUSIONES

-El presente trabajo demuestra que las cepas de *H. vermiformis* crecidas monoxénicamente producen zimogramas con bandas compartidas y bandas únicas para cada cepa.

-Las isoenzimas propionil-esterasa (PE) y fosfatasa ácida (FA) permitieron identificar una homogeneidad bioquímica entre las cepas 1534/7A, 1534/7B y PT-1, con variaciones en el bandeo referente a la cepa 1534/12. Sin embargo, esta última cepa exhibió idéntico perfil isoenzimático para la enzima leucín-amino-peptidasa (LAP) en relación con el resto de las cepas.

-En este sentido, la cepa 1534/12 mostró diferentes zimogramas en 4 de los 5 sistemas enzimáticos (excepto para la isoenzima LAP), en los cuales difiere ligeramente por la intensidad de una de las bandas, evidenciando la existencia de diferentes zimogramas dentro de la especie *H. vermiformis*.

-Las isoenzimas fosfo-gluco-mutasa (FGM) y glucosa-fosfato-isomerasa (GFI) permitieron detectar diferencias entre las cepas 1534/12 y 1534/7B: una y dos bandas en el caso de la FGM; tres y una bandas en el caso de la GFI, respectivamente.

-El comportamiento en el patrón de bandeo de las cepas PT-1 y 1534/7A es idéntico respecto a estas isoenzimas, lo que sumado a lo anteriormente mencionado, refuerza la idea de que la cepa PT-1 es ciertamente una *H. vermiformis*.

-El análisis isoenzimático de los 5 sistemas analizados (PE, FGM, GFI, FA y LEA) puede emplearse como parte de la caracterización de la especie *Hartmannella vermiformis*. La técnica de IEF en agarosa expresa -como lo demuestra este estudio- la singularidad de los zimogramas de la especie. Asimismo, el método permitió reconocer bioquímicamente a cepas de la misma especie provenientes de áreas geográficas distintas.

-La similitud notable en el patrón de bandeo de proteínas totales, permite afirmar, que las cepas estudiadas en el presente trabajo pertenecen efectivamente a la especie *H. vermiformis*.

-Por microscopía de luz y electrónica se evidenciaron aspectos de comportamiento así como de estructuras útiles para la clasificación de la cepa PT-1, como desplazamiento, mitocondrias, membrana celular, núcleo y cubierta del quiste, permitiendo ubicarla dentro del género *Hartmannella*.

BIBIOGRAFÍA

Ariza, C., Guevara, D. C., Cutillas, C. & De Rojas, M. (1991). Identificación de dos especies de amebas del género *Hartmannella* aisladas en agua dulce en la provincia de Sevilla. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat (sec. Biol)*. **87**(1-4): 231-237.

Band, N. R. & Kopachik, J. W. (1991). Virulence-related protein synthesis in *Naegleria fowleri*. *Inf. Imm.* **59** (11): 4278-4282.

Batista, D. N., Mascaró, L.C., Guevara, B. D. C. & Osuna, C. A. (1982). Capacidad patógena para el ratón albino de algunas especies de *Acanthamoeba* y *Hartmannella*. *Rev. Iber. Parasitol.* **42** (1): 95-102.

Breiman, R. F., Fields, B. S., Sanden, G. N., Volmer, L. J., Meier, A. & Spika, J. S. (1990). Association of shower use with legionnaires disease. Possible role of amoebae. *J. A. M. A.* **263** (21): 2924-2926.

Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E., Hernández, D. & Suárez, G. (1995). *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research*. En prensa.

Cerva, L., Serbus, C. & Skocil, V. (1973). Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Fol. Parasitol. (Praha)*. **20**: 97-103.

Cerva, L. & Huldt, G. (1974). Limax amoebae in five swimming-pools in Stockholm. *Fol. Parasitol. (Praha)*: **21**: 71-75.

Chamorro, L., Sesma, M. M. J. & Ramos, Z. L. M. (1988). Estudio del poder patógeno de amebas de vida libre aisladas en el tracto intestinal de reptiles. *Exp. Parasitol.* **65**: 154-155.

Daggett, P. M. & Nerad, T. A. (1983). The biochemical identification of Vahlkampfid amoebae. *J. Protozool.* **30** (1): 126-128.

De Jonckheere, J. F. & Van De Voorde, H. (1976). The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26** (1): 10-15.

De Jonckheere, J. F. (1982a). Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. **133 A**: 319-342.

De Jonckheere, J. F. (1982b). Hospital hydrotherapy pools treated with ultraviolet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *J. Hyg (Camb)*. **88** (2): 205-214.

De Jonckheere, J. F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* **30** (4): 701-706.

De Jonckheere, J. F. (1984). *Notes of the Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. E.N.E.P.I. UNAM. México. pp. 1-70.

De Jonckheere, J. F. & Michel, R. (1988). Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.* **74**: 314-316.

Detterline, J. L. & Wilhelm, W. E. (1991). Survey of pathogenic *Naegleria fowleri* and thermotolerant amebas in federal recreational waters. *Trans. Am. Micros. Soc.* **110** (3): 244-261.

Enyaru, J. C. K., Odiit, M., Gashumba, J. K., Carasco, J.F. & Rwendeire, A. J. J. (1992). Characterization by isoenzyme electrophoresis of trypanozoon stock sleeping sickness endemic areas of south-east Uganda. *Bull. World. Health. Org.* **70** (5): 631-636.

Fields, B. S., Nerad, T. A., Sawyer, T. K., King, C. H., Barbarre, J. M., Martin, W. T., Morrill, W. E. & Sanden, G. N. (1990). Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J. Protozool.* **37** (6): 581-583.

Fluviá, C., Mascaró, C., Guevara, D. C., Pérez, M. I., Mascaró, M. L. & Osuna, A. (1983a). Aislamiento de amebas de vida libre a partir de aguas minerales y minero-medicinales envasadas. *Rev. Iber. Parasitol.* **43** (1): 33-38.

Fluviá, C., Mascaró, C., Pérez, M. I., Mascaró, M. L., Guevara, D. C. & Osuna, A. (1983b). Evolución de las poblaciones de amebas limax (Protozoa: Lobosea) en aguas embotelladas: influencia del tiempo de almacenamiento. *Rev. Iber. Parasitol.* **43** (2): 155-159.

Fiordaliso, I., Christie, J. & Moffitt, C. (1992). Primary amoebic meningoencephalitis. North Carolina, 1991. *J. A. M. A.* **268** (7): 862-863.

Gordon, S. M., Steinberg, J. P., Dupuis, M. H., Kozarsky, P. E., Nickerson, J. F. & Visvesvara, G. S. (1992). Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. *Clin. Inf. Dis.* **15**: 1024-1030.

Jaramillo, Y. R., Chávez, M. G., Olvera, J. R. y Martínez, J. A. 1989. Encefalitis por una nueva amiba de vida libre, probablemente leptomixida. *Patologia.* **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.

John, D. T. & Hoppe, K. L. (1990). Susceptibility of wild mammals to infection with *Naegleria fowleri*. *J. Parasitol.* 76 (6): 865-868 .

Kadlec, V. (1978). The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animals. *J. Protozool.* 25 (2): 235-237.

Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1986). Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* 33 (3): 422 -434.

Martínez, A. J. (1991). Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev. Inf. Dis.* 13 (suppl. 5): 5399-5402.

Ma, P., Visvesvara, G. V., Martínez, A. J., Theodore, F. H., Daggett, P. M. & Sawyer, T. K. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: A review. *Rev. Inf. Dis.* 12 (3): 490-513.

Meryeryan, H. (1991). The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev. Inf. Dis.* 13 (suppl 5): s390-1.

Mirelman, D., Bracha, R. & Chayen, A. (1986). *Entamoeba histolytica*: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Exp. Parasitol.* 62: 142-148.

Moss, D. M., Brandt, F. H., Mathews, H. M. & Visvesvara, G. S. (1988). High-resolution polyacrilamide gradient gel electrophoresis (PGGE) of isoenzymes from five *Naegleria* species. *J. Protozool.* 35 (1): 26-31.

Nerad, T. A. & Daggeet, P. M. (1979). Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.* 26 (4): 613-615.

O'Dell, W. D. (1979). Isolation, enumeration and identification of amoebae from a Nebraska lake. *J. Protozool.* 20 (2): 265-269.

Page, F. C. (1980). A light and electron microscopical comparison of limax and flabellate marine amoebae belonging to four genera . *Protistol.* T. XVI, Fasc. 1: 57-78.

Page, F. C. & Blanton, R. L. (1985). The Heterolobosea (Sarcodina : Rhizopoda) a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistol.* T. XXI, Fasc. 1: 121-132.

Page, F.C. (1985). The limax amoebae: comparative fine structure of the Hartmannellidae (Lobosea) and further comparisons with the Vahlkampfiidae (Heterolobosea). *Protistol.* T. XXI, Fasc. 3 : 361-383.

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

Pérez, M. I., Mascaró, M. L., Mascaró, M. C y Osuna, A. (1983). *Hartmannella* spp. y *Naegleria fowleri*: Estudio electroforetico de proteínas totales (Protozoa, Lobosea). *Rev. Iber. Parasitol.* 43 (1): 93-100.

Perrin, P., Cariou, M. L. & Jacquier, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* 32 (4) : 592-603.

Proctor, E. M., Isaac-Renton, J. L., Boyd, J., Wong, & Qiowie, W. R. (1989). Isoenzyme analysis of human animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 (4): 411-415.

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. & Medina, F. (1984). Meningoencefalitis amebiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. de Medicina. México.* 27(3):113-122.

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., Bonilla, P., Ramírez, E., Ramírez, P. & Paulín, P. (1988). *Pathogenic Amoebae Isolated from the Atmosphere of Mexico City and Environs*. En: Abbou, R. 1988. *Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment*. Ed. Elsevier Science Amsterdam, The Netherlands: 1175-1179.

Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J. 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., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. & Chávez, M. (1992). Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* 61: 17-36.

Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D., & Rivera, V. M. (1994). Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico city and its suburbs. *Water, Air and Soil Poll.* 74: 65-87.

Sanden, G. N., Morrill, W. E., Fields, B. S., Breiman, R. F. & Barbaree, J. M. (1992). Incubation of water samples containing amoebae improves detection of *Legionella* by the culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (6): 2001-2004.

Sawyer, T. K. (1989). Free-living pathogenic and non-pathogenic amoebae in Maryland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (5): 1074-1077.

Shaw, R.Ch. & Prasad, R. (1970). Starch-gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem.Genetic.* 4:297-320.

Stehr-Green, J. K., Bailey, T. M., Brandt, F. H., Carr, J. H., Bond, W. N. & Visvesvara, G. V. (1987). *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers. *J.A.M.A.* 258 (1): 57-60.

Stevens, A. R., Shulman, S. T., Lansen, T. A., Cichon, M. J. & Willaert, E. (1981). Primary amebic meningoencephalitis: a report of two cases and antibiotic and immunologic studies. *J. Infect. Dis.* 143 (2): 193-199.

Tilgner, H. & Michejda, J. (1978). Lactate dehydrogenase in amoeba *Acanthamoeba* sp. in different phases and conditions of culture. *Com. Biochem. Physiol.* 61 B: 13-20.

Ubelaker, J. E. (1991). *Acanthamoeba* spp. "Opportunistic pathogens". *Trans. Am. Microsc. Soc.* 110 (4): 289-299.

Upadhyay, J. M., Crow, S. & Cox, A. (1984). The cyst wall composition of *Hartmannella glabra* (41815). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175: 424-428.

Visvesvara, G. S., Mirra, S. S., Brandt, F. H., Moss, D. M., Mathews, H. M. & Martínez, A. J. (1983). Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* 18(6):105-1412.

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

Visvesvara, G. S., & Stehr-Green, J. K. (1990). Epidemiology of free-living amoeba infections. *J. Protozool.* 37 (4): 255-335.

Wadowsky, R. M., Butler, L. J., Cook, M. K., Verma, S. M., Paul, M. A., Fields, B. S., Keleti, G., Sykora, J. L. & Yee, R. B. (1988). Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoeba as growth factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (11) : 2677-2682.

Wadowsky, R. M., Wilson, T. M., Kapp, N. J., West, A. J., Kuchta, J. M., States, S. T., Dowling, J. N. & Yee, R. B. (1991). Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47** (7) : 1950-1955.

Weekers, P. H. H. (1993). *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. Ecophysiological, biochemical and molecular biological differences. Tesis Doctoral. Universidad Católica de Nijmegen.

Weekers, P. H. H. & Van Der Drift, C. (1993). Nitrogen metabolizing enzyme activity in the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmannella vermiformis*. *J. Euk. Microbiol.* **40** (3): 251-254.

Weekers, P. H. H., Bodelier, P. L. E., Wijen, J. P. H. & Vogels, G. D. (1993). Effects of grazing by the free-living amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (7) 2317-2319.

Weldon-Linne, M., Tan, B. A., Rhone, D. P., Penning, Ch. L. & Visvesvara, G. S. (1992). *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with AIDS. *Am. J. Clin. Pathol.* **97**: 460.

Wiley, C. A., Safrin, R. E., Davis, C. E., Lampert, P.W., Braude, A. I., Martínez, A. J. & Visvesvara, G. S. (1987). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with AIDS. *J. Infect. Dis.* **155** (1) : 130-133.