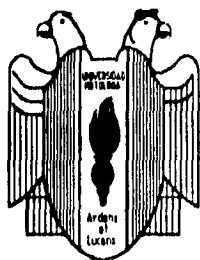


302827  
30  
2ij



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.**

**ESCUELA DE QUIMICA**

**CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M**

**RESISTENCIA A LA LISIS POR COMPLEMENTO  
DE AMIBAS DE VIDA LIBRE CON DIFERENTE  
PATOGENICIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:  
MONICA RANGEL LOPEZ**

México, D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**El presente trabajo se realizo en el Laboratorio de Protozoología del departamento de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El proyecto conto con financiamiento de la Dirección de Estudios de Posgrado e investigación del IPN. Proyecto No. 9520044**

**Bajo la dirección de: Q.F.B. Lourdes Calvo Méndez.**

## **DEDICATORIA**

**A DIOS.**

**A mi madre, Darvelia López Toledo por que gracias a su cariño, apoyo y comprensión e podido alcanzar esta meta en mi vida como Q.F.B. y a partir de esto; darme más confianza y demostrarme que con empeño y responsabilidad puedo obtener todo lo que me proponga.**

**A mi padre, Héctor Rangel Díaz que con su apoyo y dedicación me motivo a seguir adelante brindandome sus consejos y experiencias para lograr obtener este título que es mi más vallosa herencia.**

**Por ello, les dedico este trabajo con todo mi corazón y respeto.**

**Gracias por su confianza**

# INDICE

Página

## Capítulo I. INTRODUCCION:

1.1. Planteamiento del problema .....	1
1.2. Objetivo.....	3

## Capítulo II. ANTECEDENTES:

2.1.1. Taxonomía de <u>Acanthamoeba spp</u> .....	4
2.1.2. Características morfológicas .....	4
2.1.3. Ciclo de vida.....	7
2.1.4. Vía de entrada .....	9
2.1.5. Patogenicidad(EAG).....	9
2.1.6. Síntomas.....	10
2.1.7. Diagnóstico.....	10
2.1.8. Tratamiento.....	11
2.1.9. Patogenicidad (infección ocular).....	12
2.1.10 Síntomas.....	12
2.1.11 Diagnóstico.....	13
2.1.12 Tratamiento.....	13
2.2.1. Taxonomía de <u>Naegleria spp</u> .....	14
2.2.2. Características morfológicas.....	14
2.2.3. Ciclo de vida.....	17
2.2.4. Vía de entrada.....	18
2.2.5. Patogenicidad.....	18
2.2.6. Síntomas.....	19
2.2.7. Diagnóstico.....	19
2.2.8. Tratamiento.....	20
2.2.9. Control y Prevención.....	20
2.3.1. Complemento.....	21

**Capítulo III**  
**PARTE EXPERIMENTAL.**

3.1. Diagrama de flujo.....	24
3.2. Material de laboratorio, reactivos, equipo.	
3.2.1. Material de laboratorio.....	25
3.2.2. Material Biológico.....	25
3.2.3. Reactivos.....	26
3.2.4. Equipo.....	26
3.3. Metodología	
3.3.1. Aislamiento de amibas.....	27
3.3.2. Fuente de complemento.....	28
3.3.3. Titulación de hemolisina.....	28
3.3.4. Titulación de complemento.....	31
3.3.5. Obtención de trofozoitos amibianos.....	33
3.3.6. Ensayo amiba-complemento.....	33
3.3.7. Determinación de la patogenicidad amibiana.....	34

**Capítulo IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSION.**

4.1. Resultados.....	35
4.2. Discusión.....	39

**Capítulo V**

5.1 Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42

# **CAPITULO 1**

## INTRODUCCION

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

A pesar de que las amibas Naegleria spp y Acanthamoeba. spp son organismos de vida libre pueden comportarse como patógenos oportunistas y ocasionar Meningoencefalitis Amibiana Primaria(MAP) causada por Naegleria spp. y Queratitis, Encefalitis granulomatosa amibiana(EGA) por Acanthamoeba spp. ya que estos organismos pueden penetrar en el humano a través de la vía nasal de agua y aire contaminadas en forma de quistes o trofozoítos.<sup>3,5,7</sup>

Estas amibas se han encontrado con facilidad: En agua dulce, agua salada, piscinas, agua potable, aguas termales, suelo y aire.<sup>25,26</sup>

Los mecanismos de defensa contra Naegleria spp. y Acanthamoeba spp. todavía no están claros, sin embargo el sistema de complemento puede jugar un papel significativo en la resistencia a la infección.

Se ha observado que las cepas no patógenas o debilmente patógenas se lisan fácilmente por el complemento humano o de cobayo. Las cepas virulentas, evitan de alguna manera el activar el complemento por vía alterna, para así no inducir la lisis mediada por complemento y se ha observado que el grado de resistencia al complemento es proporcional al grado de virulencia.<sup>24</sup>



La resistencia a la lisis por complemento puede ser un buen parámetro para separar amibas de vida libre patógenas y no patógenas debido a que estos organismos puedan penetrar en el humano por las vías ya mencionadas. Por esta razón en este proyecto de investigación se propone utilizar este parámetro con metodología poco costosa para determinar la presencia de amibas patógenas en los aislamientos que se obtengan de sistemas de aires acondicionados en la ciudad de Chihuahua.

## **1.2.OBJETIVOS**

Diferenciar las amibas no patógenas de las que pueden ocasionar meningoencefalitis en el ratón, mediante la resistencia a la lisis mediada por complemento a una cepa de Acanthamoeba spp a una cepa de Naegleria spp.

Determinar la patogenicidad de las cepas amibianas utilizadas, mediante la inoculación de animales de experimentación (ratones) por vías intracraneal y nasal.

## **CAPITULO 2**

## ANTECEDENTES

Acanthamoeba spp.

### 2.1.1. TAXONOMIA PROPUESTA POR PAGE:<sup>24</sup>

Orden: Amoebida

Familia: Acanthamoeba

Género: Acanthamoeba

Especie: castellanii

poliphaga

culbertsoni

Astronyxis

### 1.1.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS:

**Estructura del trofozoíto:** Representa la fase vegetativa y proliferativa de Acanthamoeba spp. Los trofozoitos se diferencian de otras amibas por la presencia de 2 tipos de pseudópodos llamados lobopodios y a lo largo del perímetro celular, finas proyecciones llamadas filopodios o acantopodios que aparecen y desaparecen en la locomoción de la amiba. Los trofozoitos miden de 20 a 40 micras y pueden presentar formas ovales alargadas o irregulares.<sup>13,19</sup>

El citoplasma se observa granulado con gran cantidad de vacuolas (contractiles y alimenticias) y un núcleo único con un gran nucleolo que se localiza en el centro, ribosomas libres, vesículas pequeñas, túbulos, aparato de Golgi, retículo endoplasmico liso (REL) y retículo endoplásmico rugoso (RER), vacuolas digestivas y contractiles.<sup>13,25.</sup>

La locomoción es lenta con un movimiento deslizante y en el borde de la célula se observa refrigente debido a las finas proyecciones hialinas o acantópodos que salen de su superficie<sup>5,6</sup>

**\_Estructura de la fase quística:** Presentan un diámetro medio entre 11 y 23 micrómetros la pared quística consiste en dos capas una externa(exoquiste) y otra interna (endoquiste). Estas capas se encuentran más o menos separadas y se juntan en algunos puntos para formar orificios de salida o poros que se encuentran cerrados por un tapón denominado opérculo.<sup>5,13,26.</sup>

El citoplasma del quiste inmaduro es tan denso que dificulta la descripción adecuada de la ultraestructura de muchos de los organelos.

El citoplasma del quiste maduro contiene glóbulos de lípidos, lisosomas, mitocondrias generalmente esféricas y endoplasmico en forma circular y rodeando a mitocondrias, núcleo, vacuolas alimenticias y otras inclusiones.<sup>3,5</sup>(Fig 1)

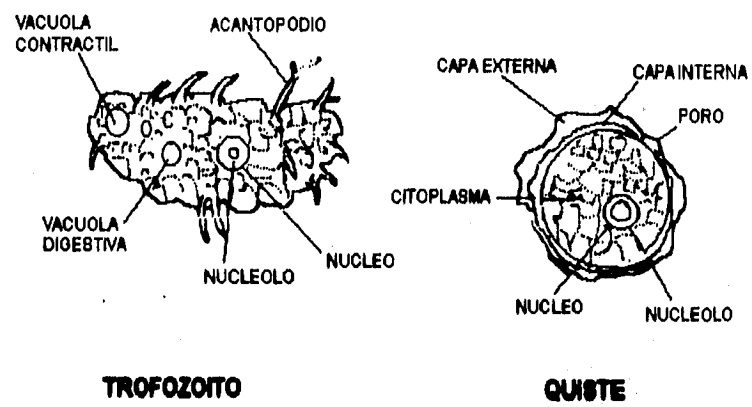


Fig. 1.- Características morfológicas de Acanthamoeba spp.

### **2.1.3. CICLO DE VIDA DE Acanthamoeba :**

El trofozoito forma quiste cuando hay desecación u otras condiciones adversas, como presión elevada, pH elevada, disminución de la tensión de oxígeno, baja en fuente de carbono y puede revertir a la forma vegetativa o proliferativa cuando las condiciones son favorables

El enquistamiento se induce por la transferencia de trofozoítos a un medio no nutritivo o adicionado de inhibidores metabólicos. Los quistes maduros se desquistan cuando retornan a un medio de crecimiento adecuado y representan división celular amitótica que ocurre en la fase trofozoítos produciendo una enfermedad llamada encefalitis amibiana granulomatosa (EAG).<sup>12,13,18</sup>(Fig 2)

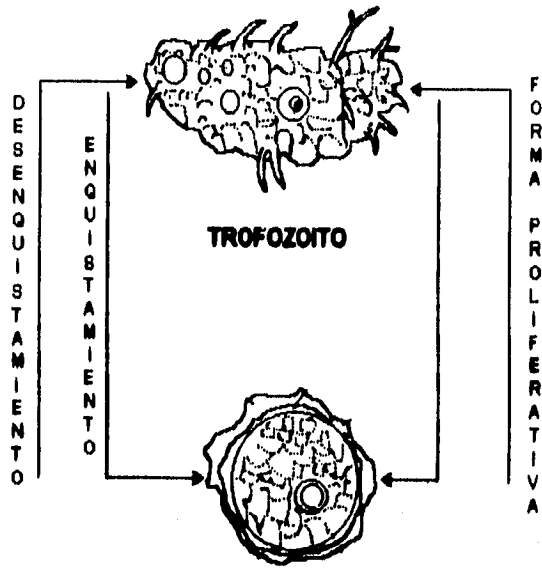


Fig. 2.- Ciclo de vida de Acanthamoeba spp



**2.1.4. VIA DE ENTRADA:** <sup>13,29,30</sup>

- .Tracto respiratorio
- .Ulceraciones de la piel
- .Mucosas o heridas abiertas

**2.1.5.PATOGENICIDAD:**

**Encefalitis granulomatosa amibiana(Acanthamoebiasis):** Es una infección del sistema nervioso central (SNC) adquirida por la vía del neuroepitelio olfatorio. Los hemisferios cerebrales, cerebelo y bulbo raquídeo presenta áreas de ablandamiento asociado a necrosis y hemorragias, hay aplastamiento de las circunvoluciones y estrechamientos de los surcos debidos al edema cerebral. Un hecho prominente , es la presencia de herniación en el área del hipocampo y las amígdalas cerebelosas. La materia gris y blanca puede presentar reacción granulomatosa, con células gigantes multinucleadas y ligera astrocitosis.

En los casos de pacientes inmunocomprometidos, pueden estar ausentes las células gigantes multinucleadas. Esta infección ocurre con por lo general en individuos debilitados, crónicamente enfermos o bajo tratamiento inmunodepresor. El período de incubación esta referido apartir de 10 días hasta 3 meses.

En las áreas más afectadas se encuentran comúnmente trofozoito y quistes. <sup>8,10,26,27</sup>

**2.1.6. SINTOMAS:** <sup>8,27,31.</sup>

- |                                     |                   |
|-------------------------------------|-------------------|
| .Dolor de cabeza                    | Ataxia cerebelosa |
| .Fiebre alta                        | Coma              |
| .Rígidez de la nuca                 | Muerte            |
| .Náusea                             |                   |
| .Convulsiones                       |                   |
| .Vómito                             |                   |
| .Irritabilidad                      |                   |
| .Alucinaciones                      |                   |
| .Cambios de personalidad            |                   |
| .Parálisis de los nervios craneales |                   |
| .Confusión Letargia                 |                   |
| .Somnolencia                        |                   |

**2.1.7. DIAGNOSTICO:**

No existe un perfil basado en síntomas y signos por lo que en el paciente se toma en cuenta lo siguiente: los antecedentes epidemiológicos, historia social, el estilo de vida, la edad y el estado inmunológico, lo mencionado puede contribuir a la sospecha del padecimiento.<sup>5,9,12</sup>

Técnicas de diagnóstico: Neuroimagen (tomografía axial computarizada y resonancia magnética nuclear) examen de líquido cefalorraquídeo (LCR), biopsia de tejido, diagnóstico directo en microscopio de luz visible, microscopía electrónica y cultivo.

**Tejido para diagnóstico:** Se realiza mediante una biopsia de tejido en donde se observan úlceras crónicas que contienen trofozoitos y quistes, se presentan por lo general en EGA (Este examen se debe de realizar en una etapa temprana ya que el éxito terapéutico disminuye con el tiempo una vez que aparecen los síntomas clínicos).

**Líquido cefalorraquídeo:** Se le realiza un análisis citoquímico y se observa una predominancia de linfocitos. Las concentraciones de glucosa son bajas y las proteínas se encuentran ligeramente alteradas.

**Técnicas inmunológicas:** En este se observan la presencia de anticuerpos en contra de Acanthamoeba spp en LCR.

**Examen directo a través de microscopía de luz visible y electrónica:** Se realiza observando las características morfológicas tanto de quistes como trofozoitos permitiendo así la diferenciación con otras amibas de vida libre.  
13.

### **2.1.8. TRATAMIENTO:**

Se ha demostrado que la sulfadiazina tiene efectos terapéuticos en ratones infectados experimentalmente con Acanthamoeba spp. aunque en infecciones avanzadas resulta inefectiva. La anfotericina B y el miconazol por vía intravenosa e intracraneal parecen ser los fármacos que mejor funcionan en el tratamiento de la EAG..

Un tratamiento temprano es importante debido a que el éxito terapéutico disminuye con el tiempo una vez que aparecen los síntomas clínicos.<sup>30,32.</sup>

### **2.1.9. INFECCION OCULAR:**

La produce principalmente Acanthamoeba spp y es una infección crónica poco común pero altamente devastadora de la córnea.

La infección ocurre generalmente en individuos jóvenes, sanos e inmunocomprometidos, y pueden presentarse por el contacto directo de la amiba con la córnea o por el contacto con cuerpos extraños o líquidos contaminados con dicha amiba. Los quistes o trofozoitos se localizan generalmente en el estroma de la cornea y al frente de la membrana de "Descemet" o más profundos en el cuerpo ciliar y tejido uveal, la iritis y uveitis pueden ser el resultado de la deseminación hematógica más que de una invasión directa.<sup>2,4,9,12,19</sup>

### **2.1.10. SINTOMAS:<sup>7,4,31</sup>**

- .Inflamación ocular aguda
- .Enrojecimiento
- .Congestión intensa
- .Fotofobia
- .Dolor ocular severo
- .Reacción de mediana intensidad en cámara anterior
- .Erosiones del epitelio corneal recurrente en pseudodendritas
- .Evolución crónica con curso progresivo a pesar del tratamiento.

#### **2.1.11. DIAGNOSTICO DE QUERATITIS OCULAR:**

El diagnóstico de queratitis por Acanthamoeba spp generalmente es erróneo debido a que la infección es poco común y se llega a el diagnóstico diferencial sino hasta después de semanas o meses en que la terapia para otros patógenos resulta inefectiva.

Técnicas de Diagnóstico: Raspado de la cornea con un hisopo tiñendo el material obtenido, las tinciones pueden realizarse con Giemsa, tricromica Writh, Gram a 40 x en un microscopio estandar de luz visible y cultivar el raspado con placas con cultivo monoxenico (medio NNE adicionandoles una bacteria que favorezca su crecimiento), si el paciente usa lentes de contacto también se sembrara en este medio, ya que se le atribuye a ellos el 80% de infección, por que en las soluciones limpiadoras de lentes de contacto pueden crecer las amibas y en ellas pueden contaminarse los lentes.<sup>2,9,13.</sup>

#### **2.1.12. TRATAMIENTO:**

Se han utilizado ketoquenazol, miconazol, e insetionato de propamidina, pero ha sido necesaria realizar después la queratoplastia penetrante para recobrar la visión completa.<sup>5,6,7</sup>

Naegleria spp.

**2.2.1. TOXONOMIA PROPUESTA POR PAGE: <sup>24</sup>**

Orden: Schizopyrenida

Familia: Vahikampfiidae

Genéro: Naegleria

Especie: fowleri

aerobia

invadens

gruberi

lovanensis

australiensis

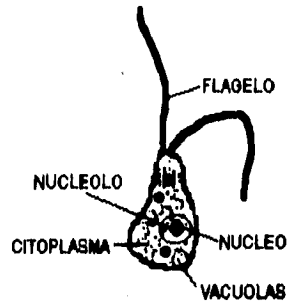
**2.2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS:**

Esta constituida por amibas de vida libre en cuyo ciclo de vida se presenta un estado flagelar temporal, además de los estados de quiste y trofozoito.<sup>15,34.</sup>

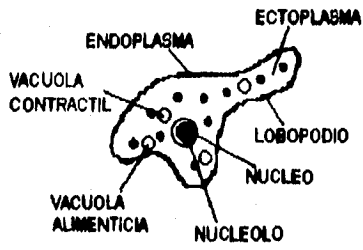
**Estructura del Trofozoito:** Son muy activos, de tamaño y forma variable, se caracterizan por presentar pseudópodos en forma roma llamados lobopodio y miden de 8 a 30 micras de diametro, el citoplasma es finamente granular y contiene un núcleo claro, con una nucléolo central prominente, también llamados cariosomas, vacuolas contrátiles y alimenticias, la superficie externa de los trofozoitos es irregular.

Quando el medio ambiente es favorable, por ejemplo, cuando baja el suministro de alimento en el medio de cultivo, o cuando esta presente un fármaco, el trofozoíto se redondea y forma un quiste.

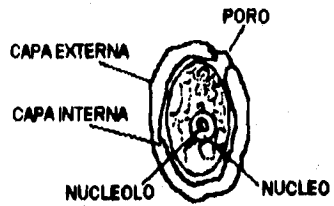
**Estructura de la fase quística:** La pared quística consiste en dos capas una externa y otra interna se unen para formar un orificio de salida o poro tiene forma circular, la morfología de los poros es muy variable. El citoplasma es finamente granular y tiene un núcleo característico que se presenta centralmente. Los quistes presentan una baja resistencia a la desecación.<sup>18,33,34</sup> (Fig 3).



**FORMA FLAGELADA**



**TROFOZITO**



**QUISTE**

Fig 3.- Características morfológicas de Naegleria spp



2.2.3.- CICLO DE VIDA : El trofozoito o forma quística de *Naegleria* spp desarrolla temporalmente, de dos a nueve flagelos cuando entra en contacto con agua destilada. E. Trofozoito, bajo condiciones adversas (deshidratación, cambio de ph, cambio de tensión de oxígeno) se enquista tolerando la desecación indefinida. Cuando el medio contiene componentes nutricionales adecuados, el desenquistamiento se lleva a cabo y el trofozoito emerge a través del poro.<sup>1,3,5</sup> (fig. 4).

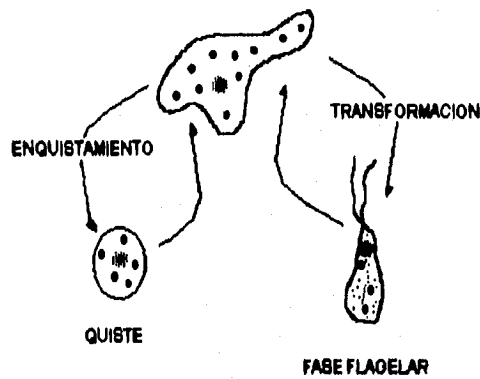


Fig. 4.- Ciclo de vida de la *Naegleria* spp.

**2.2.4. VIA DE ENTRADA:**<sup>13,29,30,31</sup>

- .Tracto respiratorio
- .Ulceraciones de la piel
- .Mucosa o heridas abiertas

**2.2.5. PATOGENICIDAD:**

**\_Meningoencefalitis amibiana primaria(Naegleroomibiasis):**Es una enfermedad de carácter agudo y rápidamente fatal que afecta siempre las meninges y el encéfalo. Afecta principalmente a niños, jóvenes y adultos sanos e inmuno comprometidos que se contaminan por nadar en lagos y albercas que es en donde se reproduce esta amiba. Las lesiones en el SNC se caracterizan por una meningoencefalitis aguda necrosante y hemorrágica.

La corteza cerebral muestra numerosas hemorragias, que se extienden profundamente en la materia blanca subcortical . La envoltura cortical varía de región a región con respecto a la intensidad y extensión de las lesiones

La mayoría de las lesiones estan en y alrededor de la base de los lobulos orbitrofrontal y temporal, en la base del cerebro cisternas basales, hipotálamo, médula oblonga, láminas parietales .

El período de incubación puede ser tan corto como de 1 a 2 días, o tan largo como dos semanas. En las lesiones sólo se han encontrado las formas tróficas. <sup>10,11,15.</sup>

### 2.2.6. SINTOMAS:

Es de tipo agudo y hemorrágico ,es rápidamente progresivo que causa la muerte en tres días . La rápida evolución de la enfermedad y por lo tanto el muy corto período de atención médica no permite buscar otros síntomas olfatorios y gustativos que se han registrado en algunos casos , pero si se han observado manifestaciones visuales.

Son aquellos asociados con una

\_Severa irritación meníngea

\_dolor de cabeza

\_ náusea

\_vómito

\_ fiebre

\_ rigidez de cuello progresando rápidamente hacia el coma y la muerte  
5,17,18.

### 2.2.7. DIAGNOSTICO:

Se encuentran trofozoitos en el líquido cefalorraquídeo(LCR)

Examen microscópico directo del LCR observandose el típico nucleolo esférico central., exámen en fresco o de gota suspendida del LCR demuestra movilidad de amibas. Una característica distintiva de Naegleria spp es la habilidad para convertir en forma flagelada lo cuál puede ser inducida por dilución del cultivo con agua. En el LCR las amibas se confunden fácilmente con leucositos, pero pueden ser identificados por su típico nucleolo central, esférico de estas amibas.<sup>10,11</sup>

### **2.2.8. TRATAMIENTO:**

Anfotericina B y miconazol intravenosamente parecen ser efectivo pero solo si se administran en la fase temprana de la enfermedad y se ha reportado que algunos paciente sobreviven a la infección sin secuelas.<sup>17,18.</sup>

### **2.2.9 .CONTROL Y PREVENCION :**

La eliminación total de amibas de vida libre de piscina es una tarea difícil y casi imposible, debido a que constantemente son introducidos quistes y trofozoitos al agua a través del aire o de los mismos usuarios, por ello con mayor razón debe evitarse nadar en ríos, lagos o piscina en donde la calidad sanitaria del agua sea dudosa, contaminadas con materia orgánica o en aguas de albañal.

El agua de albercas para una natación segura necesita atención frecuente por personas especializadas para cuidar su limpieza, filtración y desinfección . También se deben de cuidar sus alrededores y superficies de la alberca .

Una concentración de 0.5 mg/lit de cloro libre residual a pH 7-7.6 y con un tiempo de exposición de al menos 30 minutos, es suficiente para matar el 99% de los trofozoitos de vida libre y que Naegleria spp. es más sensible que Acanthamoeba spp.

### **3.3.1. COMPLEMENTO:**

Los microorganismos que producen una patología al huésped tienen que tener un mecanismo que le permita penetrar epitelio e invadir las defensas inespecíficas del huésped. De esta última, una muy importante es el complemento, pues habitualmente las membranas celulares lo activan por la vía alterna.

El sistema de complemento está formado por una serie de glucoproteínas (proteínas) plasmáticas presentes en el suero del hombre y de animales de diferentes especies.

Este sistema tiene tres funciones vitales que son :

- \_\_\_ La activación celular
- \_\_\_ La citólisis
- \_\_\_ La opsonización

Cada una de las glicoproteínas de este sistema se encuentra en circulación como precursores inactivos hasta que sean activados secuencialmente por reacciones bioquímicas específicas, implicando degradación proteolítica con formación de dos fragmentos de tamaño diferente.

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  juegan un papel importante en la activación de algunos de los componentes.

La activación de este sistema puede efectuarse por :

Vía clásica: Por complemento antígeno-anticuerpo de la clase IgM e IgG (1,2y3) y también por activación no inmunológica en la que intervienen enzimas semejantes a la tripsina , proteína C reactiva , DNA entre otros ; la activación de los diversos componentes ocurre en el siguiente orden : C1a, C1r, C1s, C4b, C2a, C5b, C6, C7, C8, C9 Y como consecuencia se generan distintas funciones biológicas , por ejemplo aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis para polimorfonucleares , adherencia inmune , entre las principales.

Vía alterna: Puede ser activado por gran variedad de agentes como C3b que se encuentran en pequeñas cantidades en el plasma , polisacáridos bacterianos o vegetales, eritrocitos de carnero , estroma de eritrocitos humanos, IgA agregada , factor veneno de cobra, factor nefrítico. En esta vía no interviene C1, C4 y C2, pero intervienen los factores D, B, P(properina), C3 y C3b .

Todos los mecanismos reguladores están dirigidos a un fin común : limitar los efectos del complemento a la zona de activación, evitando así una activación generalizada con efectos lesivos sobre células del huésped . El sistema de complemento por reconocimiento de autoanticuerpos o depósitos tisulares de complejos inmunitarios dirigirá la respuesta contra tejidos del propio huésped.

Así pues, el complemento puede considerarse un conjunto de proteínas que constituyen un sistema regulador que interviene en la iniciación y coordinación de la respuesta inmune humoral.

La concentración de algunos componentes del complemento pueden cuantificarse mediante inmunodifusión radial que no distinguen entre moléculas biológicamente activas e inactivas. Otro método para medir la concentración de complemento se basa en la capacidad hemolítica de eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpo (hemolisina). La concentración del complemento se determina por la dilución límite del suero que lisa los eritrocitos sensibilizados. Los valores en este sistema de medición se expresa como unidades de complemento hemolítico al 50%.

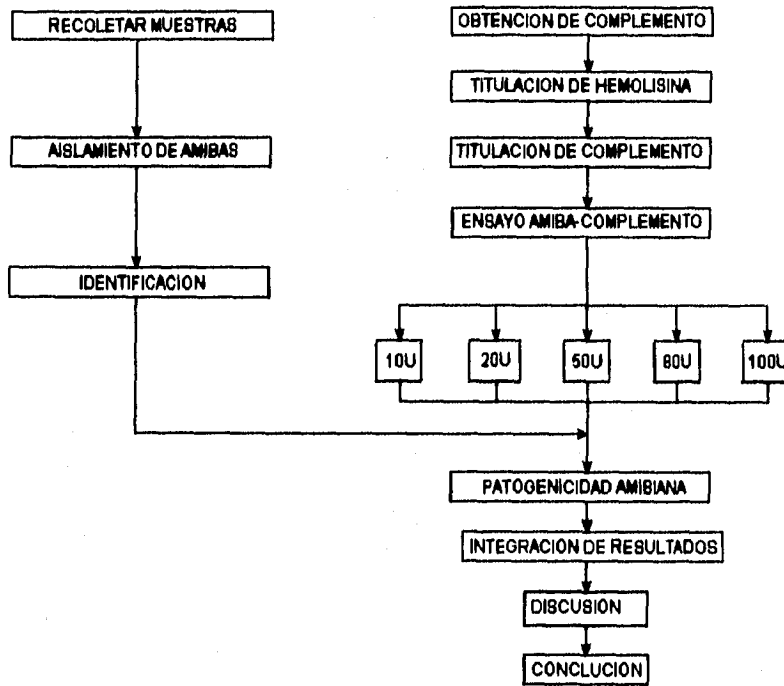
La unidad de complemento hemolítico al 50% (UH<sub>50</sub>) se define como la cantidad de complemento necesario para producir la lisis del 50% de los eritrocitos presentes en el sistema dado. Esta es una definición arbitraria, ya que su magnitud real dependerá del número de eritrocitos utilizados, su fragilidad, la cantidad y clase de hemolisina utilizada para sensibilización, la fuerza iónica del medio de reacción, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  el pH, la temperatura de incubación, etc, por lo cual, para establecer un sistema de titulación del complemento estos factores deberán ser definidos y controlados cuidadosamente. <sup>1,14,22,32.</sup>

## **CAPITULO 3**



## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. DIAGRAMA GENERAL:



### **3.2 MATERIAL DE LABORATORIO, REACTIVOS, EQUIPO**

#### **3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO**

- Charola con hielo
- Tubos de ensaye de
- Tubos con tapón de rosca
- Matraz Erlenmeyer de 25 ml 4 pipetas serológicas de 1 ml -graduadas en centésima.
- Baño maría a 37 °C
- Cajas petri
- Tubo de centrifuga cónico graduado , de 13 ml
- Celdas para fotocolorímetro
- Pipetas serológicas
- Pipetas pasteur esteril
- Matraz Erlenmeyer de 100 ml.

#### **3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:**

- 0.5 ml de hemolisina
- 5.0 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero (GRC) lavados previamente con solución salina al 0.855 (SS) y ajustados al 1% v/v en solución salina amortiguadora de trietanolamina (TBS).
- 100.0 ml de complemento © (suero fresco de cobayo o conservado por liofilización y reconstituido al momento de utilizarse)
- 2.0ml de sangre de carnero conservada en solución de Alserver
- 100 ml de solución salina-regulador de trietanolamina-gelatina(TBS-G)

**3.2.4. REACTIVOS:**

- Medio NNE
- Medio de Bactocasitone
- Acido clorhídrico

**3.2.4. EQUIPO**

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro
- Centrifuga refrigerada
- Centrifuga clínica
- Balanza analítica
- Campana
- Incubadora

### **3.3.METODOLOGIA:**

#### **3.3.1. AISLAMIENTODE AMIBAS (TOMA DE MUESTRA)**

En tres sitios diferentes de la Ciudad de Chihuahua(México) se recolectaron muestras de agua en los aparatos de aire acondicionado durante el verano por el Dr. Rodolfo Perez Reyes de la UACH. Cada muestra fue de 500 ml incluyendo siempre un poco de sedimento . Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio y se colocaron durante dos horas en refrigerador para permitir la sedimentación de las partículas suspendidas. Posteriormente se decantaron cuidadosamente hasta reducir el contenido de los frascos a 50 ml aproximadamente .

El sedimento se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos eliminando el sobrenadante . Se añadió dos mililitros de agua destilada estéril para resuspender el sedimento y se colocaron dos gotas en una caja de petri con gelosa simple, sobre la cual se realizó un extendido previo de Escherichia coli las cajas se incubaron a 40°C y se revisaron a las 48 y 98 horas después se enviaron al Instituto Politecnico Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en donde se revisaron si los cultivos resultaron positivos, después se transfirió a tubos de rosca que contienen Bactocasitona con suero de carnero.

Los tubos para el cultivo de las amibas se lavaron con agua y escobillón después, se colocaron en una solución de ácido clorhídrico al 1% durante 24 hrs.y finalmente se enjuagaron con agua destilada, no debe de usarse jabón o detergente ya que pueden matar a las amibas.

### **3.3.2 FUENTE DE COMPLEMENTO:**

Mediante fusión cardíaca se obtuvo la sangre de 10 cobayos de aproximadamente 180 g de peso cada uno. Posteriormente se separó el suero, centrifugando la sangre durante 10 minutos 3000 rpm en una centrifuga refrigerada. El suero se distribuyó en alícuotas de 1 ml en viales de polipropileno y se guardó hasta su uso a menos 70 °C.

### **3.3.3. TITULACION DE HEMOLISINA:**

Se le da el nombre de hemolisina a los anticuerpos dirigidos contra eritrocitos que son capaces de activar al complemento. La hemolisina se produce inmunizando a un animal (generalmente conejo) con eritrocitos heterólogos (generalmente de carnero).

#### **Método:**

- 1.- Se mantuvieron todos los tubos y reactivos en un baño de hielo.
- 2.- Se marcaron los tubos del 1 al 10 y hacer 8 diluciones con factor de dilución de 2 de la hemolisina en TBS, utilizando volúmenes de 0.25 ml. Descartar 0.25 ml de tubos No.8
- 3.- Se agrego 0.25 ml de TBS al tubo No.9
- 4.- Se agrego 0.5 ml de la hemolisina original al tubo No. 10

5.- Después se le colocaron los demás reactivos según se indica en la siguiente tabla:

Tubo No.	dilución de E (.25ml)	GRC (ml)	1	C(ml)	1	TBS frío (ml)
1	1:2	0.25		0.25		0.5
2	1:4	0.25		0.25		0.5
3	1:8	0.25		0.25		0.5
4	1:16	0.25		0.25		0.5
5	1:32	0.25		0.25		0.5
6	1:64	0.25		0.25		0.5
7	1:128	0.25		0.25		0.5
8	1:256	0.25		0.25		0.5
9		0.25		0.25		0.5
10	1:1(0.5 ml)	0.25		---		0.5

**GRC:** Globulos rojos de carnero

**C:** Complemento

**TBS:** Solución salina amortiguadora de trietanolamina

Las diluciones que se señalan en la tabla se hacen a partir de la hemolisina diluida por tal motivo se debe tomar en cuenta esta dilución para los cálculos.

(1) Se incubó en el baño maría a 37°C, durante 20 minutos, con agitación frecuente.

7.- Los tubos 9 y 10 corresponden a los testigos del complemento y de la hemólisis, respectivamente y al final de la reacción no deben mostrar hemólisis.

8.- La adición final de TBS frío tienen por objetos detener la reacción debido al cambio en la temperatura óptima de la reacción y a la dilución del sistema.

El título se expresó en términos del valor inverso de la máxima dilución del anticuerpo que aún permite que se lleve a cabo la reacción.

En este caso las lecturas deben hacerse en términos de unidades 100% líticas.

Una unidad de hemolisina es igual a la menor cantidad de hemolisina que es capaz de causar la lisis del 100% de los eritrocitos en el sistema y bajo las condiciones señaladas.

En caso de presentarse dificultad para la lectura de los tubos, ésta puede facilitarse si se centrifuga todos los tubos a 2000 r.p.m durante 5 minutos.<sup>32</sup>

### **3.3.4. TITULACION DE COMPLEMENTO:**

Su objetivo es: demostrar el efecto lítico del complemento en un suero fresco , y su cuantificación en unidades hemolíticas al 50% activandolo por vía clásica.

#### **Método:**

- 1.- Se lavaron los eritrocitos de carnero por centrifugación a 1500rpm durante 10 minutos con solución de TBS-G.
- 2.- Repetir el procedimiento dos veces más y resuspender 0.2 ml del paquete en .8 ml de TBS-G para que quede una suspensión al 2% (v/v).
- 3.- Ajuste la suspensión con ayuda de un espectrofotómetro , para que los cual se colocan 0.6 ml de la suspensión al 2% en una de la celda del fotocolorímetro y se le añaden 3.4 ml de agua destilada . Leer a una longitud de onda de 550 nm, utilizando agua destilada como blanco . Una hemólisis del 100% de una suspensión al 2% debe de dar una densidad óptica de 0.5
- 4.-Después se añadió un volumen igual de la hemolisina (2UH<sub>50</sub> % ml ) a la suspensión anterior colocada en un matraz de 50 ml . Mezclar bien e incubar a 37°C en baño maría durante 30 minutos , con agitación frecuente. Retirar del baño maría y colocar en un baño de hielo . Después de este procedimiento la suspensión de eritrocitos quedará al 1% y éstos quedarán sensibilizados con la hemólisisina (GRC sens).



5.- Preparar 3 diluciones del suero problema de la siguiente manera:

1:25 0.4 ml del suero + 9.6 ml de TBS-G

1:100 5.0 ml del suero 1:50 + 5.0 ml de TBS-G

Colocar todos los tubos en baño de hielo.

6.-Disponer 11 tubos de 16x100 mm, numerados en una gradilla sumergida en un baño de hielo.

7.- Seguir las instrucciones señaladas en la siguiente tabla

8.- Agitar todos los tubos y centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos

9.- Leer el sobrenadante de cada tubo fotolorimétricamente a 550 nm, utilizando como blanco el sobrenadante del tubo No. 10.

Tubo No.	suero 1:25 (ml)	suero 1:50 (ml)	suero 1:100 (ml)	TBS G (ml)	GRC sens (ml)	*	TBS G frío	Agua dest. (ml)
1	1.0	-	-	0.8	1.2	*	1.0	-
2	0.7	-	-	1.1	1.2	*	1.0	-
3	0.3	-	-	1.5	1.2	*	1.0	-
4	-	1.0	-	0.8	1.2	*	1.0	-
5	-	0.7	-	1.1	1.2	*	1.0	-
6	-	0.3	-	1.5	1.2	*	1.0	-
7	-	-	1.0	.8	1.2	*	1.0	-
8	-	-	0.7	1.1	1.2	*	1.0	-
9	-	-	0.3	1.5	1.2	*	1.0	-
10	-	-	-	1.8	1.2	*	1.0	-
11	-	-	-	-	1.2	*	-	2.8

\*Incubar durante 30 minutos en baño maría a 37°C, con agitación frecuente.

El TBS-G frío se utiliza para detener la reacción

El tubo 10 es el testigo negativo y se usará como blanco, y el tubo 11 es el testigo positivo que corresponderá al 100% de hemólisis.<sup>32</sup>

### **3.3.5. OBTENCION DE TROFOZOITOS AMIBIANOS:**

Se sembraron 10 tubos que contenian medio de Cline con 0.2 ml cada uno de cultivo axénico de Acanthamoeba spp y se incubaron a 28 °C durante 7 dias. Este mismo procedimiento se realizó para Naegleria spp y los diferentes aislados amibianos. Después de la incubación cada especie de amibas se cosechó por separado mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos . La última pastilla se resuspendió en medio de cultivo y se realizó una cuenta en cámara de Neubauer ajustando la suspensión a  $10^{-6}$  amibas por ml.

### **3.3.6. ENSAYO AMIBAS-COMPLEMENTO:**

Utilizando placas para microtitulación con 96 pozos, se colocaron en cada pozo 50 microlitros de suspensión amibiana ( $5 \times 10^4$  amibas) más 10 unidades hemolíticas de complemento . Esta mezcla se incubo a 37 °C durante 2 hrs. Al termino del período de incubación se determinará el número de amibas vivas y muertas empleando el colorante azul de tripano. Este procedimiento también se realizó utilizando 30, 50, 80 y 100 unidades hemolíticas de complemento..

### 3.3.7. DETERMINACION DE LA PATOGENICIDAD AMIBIANA

Se inocularon lotes de 10 ratones de 14 a 16 g por vía intracraneal (IC) e intranasal (IN) y se observaron por 21 días. Por cada cepa de amibas se inoculó 0.02 ml del concentrado de Acanthamoeba spp y concentrado de Naegleria spp un lote de 7 ratones anestesiados ligeramente con éter. Los animales que murieron en este período se colocaron las porciones de su cerebro en las placas con medio NNE para aislar a las amibas y se sacrificaron a los ratones que sobrevivieron después de 21 días y su cerebro, hígado, riñón se colocaron en medio NNE a 30 °C con el fin de recuperar a las amibas. Para la inoculación de los ratones se tomó un tubo con cultivo axénico de amibas de 5 a 7 días de crecimiento y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante conservando solo el sedimento con 0.5 ml de medio que se resuspendió y ajustó a una población de  $10^5$  a  $10^6$  amibas /ml. La suspensión se tomó con una jeringa de para la inoculación.

La inoculación nasal consistió en colocar con una jeringa de 1 ml sin aguja, dos gotas de la suspensión de amibas de cada cepa, en los orificios nasales de otro lote de 5 ratones anestesiados ligeramente con éter.

## **CAPITULO 4**

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 RESULTADOS:

#### 1.- Titulación de hemolisina:

Se observó hemólisis hasta una dilución 1:164.

2.- Titulación de complemento: La Densidad Óptica(D.O) del tubo No. 8 fue de 0.04.

DETERMINACION DEL % DE HEMOLISIS					
SUERO 1:125			SUERO 1:100		
No. DE TUBOS	D.O.	%H	No. DE TUBOS	D.O	%H
1	0	0	4	.01	25 %
2	0	0	5	.019	47.6 %
3	0	0	6	.02	50 %

El volumen que da el 50 % de hemólisis corresponde a una unidad de complemento que provoca el 50 % de hemólisis (1UH 50 %).

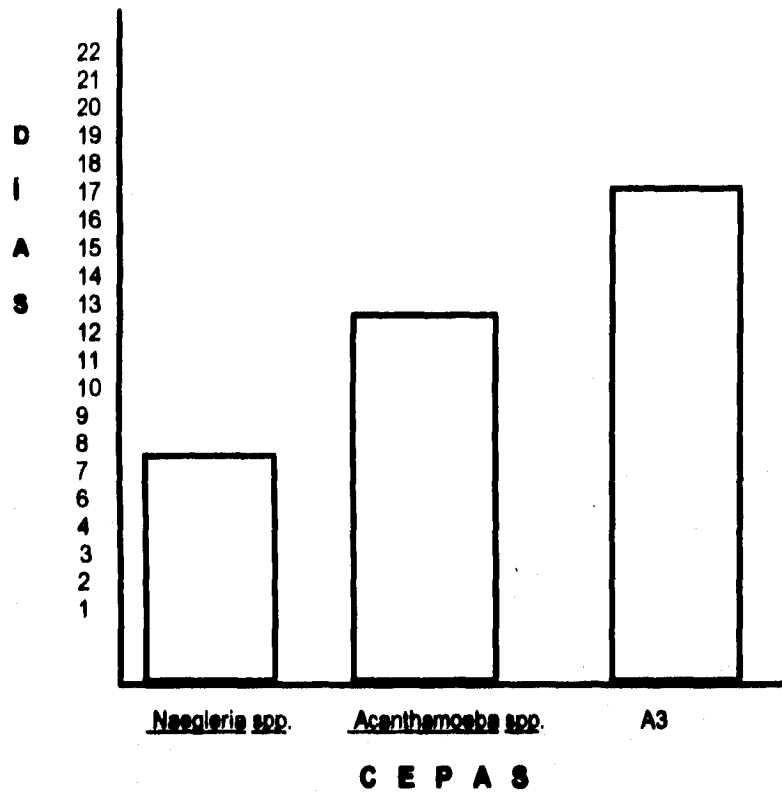
### 3.- Ensayo amiba-complemento:

PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE AMIBAS DE VIDA LIBRE CON COMPLEMENTO			
UN DE COMPLEMENTO	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Acanthamoeba</i> spp.	A3
10UH	23.7%	27.8%	39.4%
20UH	23.0%	37.7%	43.8%
50UH	28.1%	47.5%	57.6%
80UH	37.2%	63.4%	64.0%
100UH	34.2%	94.8%	100%

### 4.-Prueba de Patogenicidad:

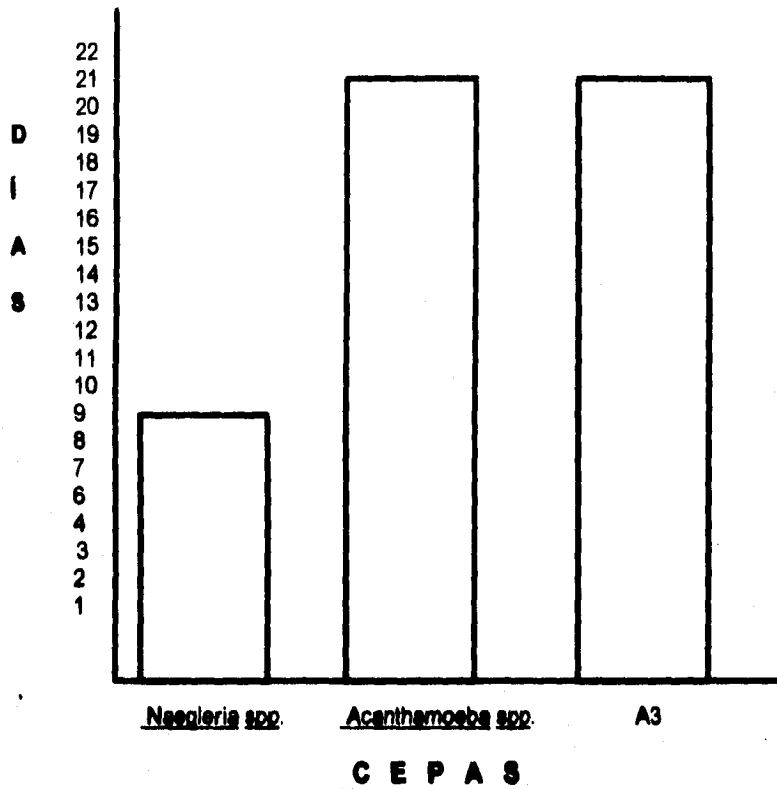
MORTALIDAD DE RATONES INOCULADOS CON AMIBAS DE VIDA LIBRE OBSERVADOS DURANTE 21 DIAS																					
CEPAS	MORTALIDAD DURANTE 21 DIAS																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<i>Acanthamoeba</i> spp			3	1	2	3	1														
<i>Naegleria</i> spp												1	1	3				1			2
A3															2			2	2		3

A3: *Acanthamoeba castellanii*



**Gráfica . 1.- Mortalidad de ratones inculados con amibas de vida libre por vía intracraneal (ic).**

En estos ratones, se observa que el cerebro infectado esta completamente hemorrágico, su hígado, riñón y pulmones tenía poca cantidad de amibas.



**Gráfica . 2.- Mortalidad de ratones inoculados con amibas de vida libre por vía intranasal (in).**

Se observó que el cerebro tenía partes blancas y hemorrágicas en su hígado, riñón y pulmones había gran cantidad de amibas .



#### **4.2 DISCUSION:**

El complemento juega un papel significativo en la resistencia a la infección ya que para que un microorganismo pueda invadir los tejidos de un huésped, debe poseer mecanismos que le permitan penetrar los epitelios e invadir las defensas inespecíficas del huésped pues habitualmente las membranas celulares lo activan por la vía alterna.

Esto lo han demostrado Whitman y Marciano-Cabral que con trabajos mediante la lisis de complemento observaron que las amibas de vida libre altamente patógenas resisten la lisis. También lo demostraron por cambios en el crecimiento en medios de cultivo definidos, ya que las cepas más patógenas son las que crecieron en el medio Cline y las cepas menos patógenas fueron las que crecieron en el medio Nelson.<sup>22,23</sup>

En el presente trabajo se ha demostrado que la prueba de lisis por complemento fue útil para diferenciar amibas patógenas de las debilmente patógenas. Variando las unidades hemolíticas de complemento, se obtuvieron diferentes porcentajes de lisis (tabla 2), determinándose que al utilizar 100 UH de complemento las cepas debilmente patógenas de amibas anfozoicas, presentan un 100 % de lisis, a diferencia de las cepas patógenas que presentan porcentajes de lisis más bajos (Tabla 2).

Para corroborar los resultados obtenidos con la prueba de lisis por complemento se inocularon ratones con las mismas cepas de amibas de vida libre observándose que los ratones a los que se les inocularon las amibas que resultaron altamente patógenas murieron en un corto tiempo (7 días) por meningoencefalitis amibiana primaria. Los ratones que fueron inoculados con las amibas débilmente patógenas murieron en un lapso de 21 días de encefalitis granulomatosa amibiana, lo anterior se puede observar en la tabla 3 en donde Naegleria spp fue mas patógena que Acanthamoeba spp

En la prueba de patogenicidad también se observó que todas las cepas estudiadas fueron patógenas ya que ocasionó la muerte a los ratones por las dos vías de inoculación que se realizaron, aunque se murieron en menos tiempo las inoculadas por vía intracraneal en donde se observó que el cerebro infectado está completamente hemorrágico y su hígado, riñon y pulmones tenían menos cantidad de amibas que los inoculados por vía intranasal . El tiempo que se llevaron los ratones en morir tomando en cuenta la vía de inoculación se observa en la gráfica 1 y 2 . Lo anterior se pudo deber a que la inoculación intracraneal invadió rápidamente el SNC y el tiempo de muerte de los ratones se debió a la virulencia de las cepas.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **CAPITULO 5**

## **CONCLUSIONES**

1.- El ensayo amiba complemento es un método útil para diferenciar amibas altamente patógenas de las amibas debilmente patógenas .

2.- Se demostró que el grado de resistencia al complemento es proporcional a la virulencia de la cepa.

3.- Los ensayos de amiba-complemento es una prueba eficaz y rápida para diferenciación de la patogenicidad de amibas anfizoicas y accesibles para cualquier laboratorio.

**5.2. BIBIOGRAFIA:**

- 1.-Bellanti J.A. Inmunología.Ed. Interamericana; 3a.Edición,287-311, 1986.
- 2.-Bottone, E.J, Madayag, R.M. Quereshi, M.N ."Acanthamoeba Keratitis : Synergy Between Amebic and Bacterial Contaminan in contact lens Care Systems as Prelude to infección" Journal of Clinical Microbiology; 30,2441-2450, 1992.
- 3.-Carter, R.F. Description of a Naegleria spp solate from two cases of primary amoebic Menigoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. J. Path; 100, 217-244, 1990.
- 4.-Centers for Disease control, Acanthamoeba spp Keratitis associated with contact lenses. MMWR ; 35, 405-408, 1986.
- 5.-Cerva, L. History and Development of pathogenic Acanthamoebas and Naegleria Research. Memorias del IV curso y Simposio Internacional sobre Biología de la contaminación. UNAM .México ; 172-180, 1986.
- 6.-De Jonckheere, J.T. ,B, Pathogenic and nonpathogenic Acanthamoeba spp in thermally polluted discharges and surface wallers J. Protozool; ;28, 56-59, 1981.
- 7.-Fernández- Quintanilla, G y F .Lares-Villa Keratitis por Acanthamoeba spp. Boletín Mensual Epidemiología. sistema Nacional de salud (México) ; 61, 17-23, 1991.

- 8.-Ferrante, A. "Free living amoebae : Pathogenicity and immunity." Parasite Immunology; 13, 31-42, 1991.
- 9.-Fritsche, T.R. Occurrence of Bacterial Endosymbionts in Acanthamoeba spp. Isolated from Corneal and Environmental Specimens and Contact Lenses. Journal of Microbiology ;31 ,112-126, 1993.
- 10.-García Tamayo, J ; J.E. González y A.J. Martínez, Meningoencefalitis Amibiana Primaria y Encefalitis amibiana Granulomatosa ;27,84-91,1980..
- 11.-John . D.T, Primary amebic Meningoencephalitis and biology of Naegleria fowleri Ann Rev. Microbiol;36, 101-125, 1993.
- 12.-Jones. D,B, Acanthamoeba spp the ultimate oportunist Am . J. Ophtalmol ;102, 527-530,1986..
- 13.-Johckheere, J.F. "Pathogenic and Nonpathogenic Acanthamoeba spp. in Thermally Polluted Discharges and Surface Waters, Journal Protozoology; 28, 56-58,1981.
- 14.-Kent, J.F. Fife, F.H Jr.. Precise standartization of reagents fro complement fixation. Amer J.Trop. Med Hyg.; 112, 103-116, 1963..
- 15.-Lares,V.F, y Col . "Five Cases of Primary Amebic Meningoencephalitis in Mexicali, México: Study of the Isolates. Journal of Clinical of Microbiology ; 31, 685-688, 1993.
- 16.-Lares, Villa, F.. "Biología y aspecto de patogenicidad de Acanthamoeba " Revista Latinoamericana de Microbiólo.; 32,71-78,1990.

- 17.-López, C.E. De León , B. De Jonckheere. J.F. 1989. .Meningoencefalitis Amibiana Primaria por Naegleria fowleri en un adolescente de Michoacán México Boletín Médico del Hospital Infantil de México ;46,619-622,1989..
- 18.-Loschiavo, F. Ventura, T.Sessa. E. .Acute Primary Meningoencefalitis from Naegleria Fowleri. ,Report pf a Clinical case with a favourable out come Acta Neurol, Napoli; 15,333-340,1993..
- 19.-Lares-Villa , F.. Biología y Aspectos de patogenicidad de Acanthamoeba spp. Rev Latinoamericana Microbiol;. 32,71-88,1990.
- 20.-López Corella E, B. De León y J .F. De Jonckheere Meningoencefalitis Amibiana Primaria por Naegleria fowleri Bol.Med.Hops Infantil .México; 46,619-622,1989.
- 21.-Marciano-Cabral. F. . Biology Of Naegleria spp Microbiology ;52,114-133.,1988.
- 22.-Marciano-Cabral and ToneyM.Denise. Alterations in Protein Expression and Complement Resilience of Pathogenic Naegleria Amoebae. Infection and Immunity ; 60, 2764-270,1992.
- 23.-Marciano-Cabral and Whiteman Y. Leslie , Resistance of Highly Pathogenic Naegleria Fowleri Amoebae to Complement-Mediated Lysis.Infection and Immunity ;57,3869-3875,1989.
- 24.-Martinez, A.J . Free-living amoeba. Natural History, Preventi6n Diagnosis, Pathology, and treatment of diasease. CRC,pres,INC.Boca raton florida;. 1985

- 25.-Martinez, A.J. Granulomatous Amebic Encephalitis .Review and Report of a Spontaneous Case from Venezuela. Acta Neuropathology the Berlin.; 87430-434.,1993.
- 26.-Martinez, A.J, Visvesvara, G.S. . Laboratory Diagnosis of Pathogenic Free living Amoebas: Naegleria spp y Acanthamoeba spp. Clinics in Laboratory, Medicine; 11, 861-872,1991
- 27.-Ockert, A.L " Identification of Acanthamoeba in bronchoalveolar lavage specimens. "Diagnostic C. y Pathology.; 8 ,231-234,1992.
- 28.-Ockert, G."Review article occurrence parasitism and pathogenetic potency of free living amoeba " Appl. Pathology; 34,77-89,1993
- 29.-Pellegrim, J.L. Neuraminidase activity in Acanthamoeba spp. species Trophozoites and cysts . Invest. Ophthalmol.Vis.. Sci; 32,3061-3066,1991
- 30.- Rivera , F y col. "Bottled Mineral Waters, Polluted by Protozoa In México "Journal Protozoology ;28,54-56,1981.
- 31.- Rivera, F. y Col. . Acanthamoeba spp en quemaduras infectadas y rinitis. Rev. Latinoamericana de Microbiología,1981.; 31,137-140
- 32.-Profesores del Departamento de Inmunology . Manual de prácticas de inmunología . E.N.C.B., I.P.N ;107-113,1983..
- 33.-Rodriguez-Perez, E.G. . Meningoencephalitis por Naegleria fowleri informe de un caso Infectología; 10,263-266,1984.
- 34.- Shoeman , C.J y Col. : Primary Amoebic Meningoencephalitis in southern Africa., Journal Infectology ;26,211-214,1993.