

95



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CAMPUS IZTACALA

DETECCIÓN DE *Naegleria fowleri* EN CUERPOS DE
AGUAS DE IMPORTANCIA TURÍSTICA EN EL
ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ

T E S I S

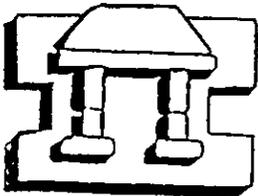
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

DANIEL GARCIA MORALES

DIRECTORA DE TESIS: Dra. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO. 2000



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.

... y si soñamos, fue con realidades.

Juan Cunha

A ti mami; Aunque no es ya posible que tengas este trabajo en tus manos, más gracias a tu amor, a la confianza que creaste en mi y al ejemplo de coraje y fuerza que le pusiste a la vida pude yo lograr esto. Te extraño mucho pero se que no podrías estar en mejor lugar.

A mis queridos hermanos: Andrés, Carmen, Gaby, Raquel, Augusto y Maribel; gracias por su eterno amor, apoyo y animo.

A mi otra gran familia La Casa de Paz.

A mis tíos y primos quienes he recibido su apoyo y amor en los momentos que mi familia lo necesito, muchas gracias a todos.

A Judith, por ser una persona tan hermosa para conmigo además de ser mi prima.

A mis amigos: Toño, Vero, Mauricio, Arely, Nacho, Omar, Lola, Paty Huerta, Tere, Jorge Ramírez, Jorge (Coco), Abel, Adrián y a todos los que compartieron conmigo esos buenos años de ser estudiante de biología.

A Rose, Leo y Verito por su amistad y el apoyo que me han brindado.

A Rafa y a su familia, Temo e Isa, por su sincera amistad.

A Alfredo y Rocío; no se podría tener mejores amigos.

A la familia León por su amistad y el soportarme tanto.

A ti Natalia, como dice Benedetti: Si te quiero es porque sos
mi amor mi cómplice y todo
y en la calle codo a codo
somos mucho mas que dos.

muchas gracias, guapísima.

Y todos los que de alguna forma me han ayudado, brindando su amistad y su cariño, motivandome a continuar adelante.

Agradecimientos

A la Dra. Elvia M. Gallegos Neyra y al Biól. Arturo Calderón Vega, por su tiempo y la dirección dada a este trabajo.

A los profesores que tan amablemente dieron su tiempo para la revisión de esta tesis, muchas gracias por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a subir la calidad de este trabajo:

Dra. Patricia Bonilla Lemus
Biól. Arturo Calderón Vega
M. en C. Elías Piedra Ibarra
Dr. Víctor Rivera Aguilar.

Al Dr. Pedro Ramírez García, por su apoyo e interés que me brindo para poder continuar y terminar mi trabajo

A Paty Bonilla, Eli, Maritza, Gaby, Lolita, Luis Fernando, Paty Chalico, Liliana, Luz, Silvana, Deyamira y Nora, gracias a ustedes la estancia en el laboratorio durante todo este tiempo fue agradable; gracias por brindarme su amistad. Y en general al proyecto CyMA, especialmente al laboratorio de Microbiología Ambiental.

A mi amada Universidad.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Amebas de vida libre.....	3
a) Descripción e importancia ecológica.....	3
b) Importancia biomédica.....	3
2. <i>Naegleria fowleri</i>	6
a) Descripción y clasificación del género.....	6
b) Ciclo de vida.....	9
c) Patogenicidad.....	10
d) Tratamiento contra la invasión de <i>Naegleria fowleri</i>	12
e) Identificación (antecedentes).....	13
f) Técnicas de identificación de AVL.....	14
3. Descripción del área de estudio.....	16
a) Estado de San Luis Potosí.....	16
b) Huasteca Potosina.....	17
c) Descripción de los sitios de estudio.....	19
III. OBJETIVOS	22
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	23
a) Recolección y transporte de las muestras.....	23
b) Aislamiento de las amebas de la especie <i>Naegleria fowleri</i>	25
c) Prueba de tolerancia de la temperatura.....	25
d) Prueba de transformación ameboflagelar.....	25
e) Axenización.....	25
f) Prueba de patogenicidad en ratones.....	26
g) Material biológico de referencia.....	26
h) Purificación del ADN de las cepas de referencia y de muestras de campo.....	26
i) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
j) Electroforesis en geles de agarosa.....	28
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
a) Recolección de muestras.....	29
b) Aislamiento de amebas por pruebas tradicionales.....	29
c) Patogenicidad en animales de laboratorio.....	34
d) Resultados de las amplificaciones de los aislados por PCR.....	35
e) Identificación directa de <i>N. fowleri</i> por PCR en las muestras de agua.....	36

VI. CONCLUSIONES	41
VII. BIBLIOGRAFÍA	42
VIII. APÉNDICE	53
1. Medios de cultivo	53
2. Reactivos para purificar, obtener y amplificar el ADN por PCR	54

I. RESUMEN

En 1965, Fowler y Carter reportaron la existencia de una enfermedad relacionada con la presencia de amebas de vida libre (AVL), conocida como Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP), infección que en la mayoría de los casos es de fatales consecuencias. Se descubrió que el principal organismo implicado en esta patología era *Naegleria fowleri*, la cual puede invadir el cerebro de una persona y causar su muerte en 72 horas; asimismo se relacionó este padecimiento con los ambientes acuáticos, principalmente los termales, donde los pacientes, por lo general jóvenes y sanos, acudían a practicar la natación.

De entonces a la fecha se han reportado muchos casos alrededor del mundo, sin embargo la MEAP es frecuentemente atribuida a organismos diferentes de aquellos que la producen, tales como bacterias, virus y hongos, organismos causantes de cuadros similares de meningitis; esto es debido generalmente a la falta de personal capacitado, así como de técnicas rápidas y seguras en la identificación certera de las AVL, potencialmente patógenas.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue adecuar un método para la fácil y rápida identificación de *Naegleria fowleri* en el ambiente, con ayuda de técnicas de biología molecular, pues un diagnóstico acertado y oportuno es indispensable para la elección del tratamiento correcto que se le proporcione al paciente.

El presente trabajo se desarrolló en el estado San Luis Potosí, México que presenta dentro de sus atractivos turísticos, balnearios de aguas termales -ambientes propicios para el desarrollo de los organismos de interés-. Se visitaron siete lugares, entre el periodo de diciembre de 1995 y enero de 1997 y de las muestras recolectadas (102), 51 fueron utilizadas para el aislamiento convencional de *Naegleria fowleri*, es decir, pruebas de tolerancia a la temperatura, de transformación ameboflagelar, microscópicas y claves taxonómicas. De éstas se obtuvieron 12 aislados potencialmente patógenos, los cuales fueron inoculados en ratones, vía intracerebral y nasal, resultando patógenos solo 6, y de estas solo un aislado provocó la muerte a los ratones en el 100% de los casos.

Por otra parte, se aisló y purificó el ADN total del otro grupo de 51 muestras y se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para un segmento específico y conocido del ADN de *Naegleria fowleri*. Con la ayuda de esta metodología se encontraron 8 muestras positivas; además, para comprobar los resultados del otro grupo, se procedió a realizar la técnica de PCR a los 12 aislados que habían resultado potencialmente patógenos, comprobándose que el que provocó la muerte a los ratones experimentales en el 100% de los casos pertenecía a *Naegleria fowleri*.

II. INTRODUCCIÓN

La identificación o detección de organismos, está relacionada con su clasificación y nomenclatura. A la clasificación se le puede definir como el ordenamiento de los organismos en grupos taxonómicos, en base a sus semejanzas o diferencias. En el caso de la clasificación de microorganismos, ya sean procariontes o eucariontes, tales como bacterias y protozoarios, se requiere además, de un conocimiento obtenido a través de técnicas experimentales y de observaciones, ya que a menudo es necesario determinar las propiedades bioquímicas, fisiológicas, genéticas y morfológicas para la descripción adecuada de un taxón (Goodfellow y Board, 1980). La nomenclatura consiste en dar nombre a un microorganismo considerando reglas internacionales de acuerdo a sus características (Sneath, 1990).

La identificación entonces, se refiere al uso práctico de un esquema de clasificación, para aislar y distinguir los microorganismos de interés de otros. Por ejemplo, en una emergencia clínica, para aislar e identificar el agente causal de una enfermedad, permitiendo la selección del tratamiento farmacológico específico para su eliminación (Schleifer y Stackebrandt, 1983).

Los esquemas de identificación no son claves de clasificación, aunque puede haber una semejanza. Sólo se puede diseñar un esquema de identificación para un grupo de microorganismos después de que este se ha clasificado, o se ha reconocido como distinto a otros microorganismos (Goodfellow y Board, 1980).

El surgimiento de la ingeniería genética en los años setenta y su espectacular desarrollo, ha logrado un gran impulso en la identificación de microorganismos relacionados con la salud pública como los protozoarios. El presente trabajo utiliza la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para la identificación de *Naegleria fowleri*, ameba de importancia biomédica debido a que produce la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) que puede ocasionar la muerte a los infectados, se ha observado que en la mayoría de los casos las personas invadidas por este organismo eran sanas, jóvenes y practicaban la natación en épocas calurosas. Por lo anterior se llevaron a cabo muestreos en diferentes cuerpos de agua (balnearios) utilizados principalmente en temporada de primavera-verano, cuando se presentan las más altas temperaturas del año en la zona de la Huasteca Potosina del estado de San Luis Potosí, cuando concurre un mayor número de personas a estos lugares para descansar o refrescarse, existiendo una mayor probabilidad de interacción de estas amebas con el ser humano, reportándose en los hospitales locales una incidencia elevada de casos de meningitis por agentes causales desconocidos (Rivera *et al.*, 1989).

1. AMEBAS DE VIDA LIBRE

a) Descripción e importancia ecológica

Naegleria fowleri pertenece al grupo de organismos denominado "amebas de vida libre" (AVL). Este grupo reúne a más de 50 géneros amebianos que en su gran mayoría son inofensivos al ser humano. Se les conoce también como gimnamebas que significa "amebas desnudas", término que se usa para diferenciarlas de las amebas testadas (Page, 1974, 1976, 1988), así como de las que son parásitos estrictos como *Entamoeba histolytica* (Martínez y Amado-Ledo, 1979). Las gimnamebas son organismos asimétricos ya que la forma de su cuerpo cambia constantemente y además presentan capacidad de enquistamiento como respuesta a cambios adversos en su medio.

Se les localiza en todos los ambientes; terrestre y aéreo pero principalmente en el acuático, por lo que pueden ser encontradas en el mar y hasta en pequeñas charcas (Martínez y Janitschke, 1985; Rivera *et al.*, 1987, 1988 y 1994; Wellings *et al.*, 1977); en donde juegan un papel importante dentro del control poblacional de las bacterias, siendo éstas, su principal alimento; otras fuentes de alimentación para estos organismos son los hongos, levaduras y algas, entre otros (Pelczar *et al.*, 1983; Wellings *et al.*, 1979). En los ambientes acuáticos, las AVL viven sobre la superficie del agua o adheridas a partículas flotantes, también se les encuentra en el sedimento si el cuerpo de agua no es muy profundo (Rodríguez, 1994). En el ambiente edáfico estas amebas participan en el incremento de la tasa de transformación del fósforo a formas aprovechables para las plantas (Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

El enquistamiento en la mayoría de las AVL les permite sobrevivir a las variaciones ambientales adversas, así como permanecer viables en sequías, cambios de pH, falta casi total de oxígeno y escasez de alimento además, les permite el desplazamiento a través de corrientes de aire, en cuyo caso, su dispersión depende del fenómeno que lo provoque (vientos principalmente) y del tamaño del quiste de la ameba; aquellos organismos que tengan medidas menores de 20 μm , podrán permanecer en el aire por más tiempo y tendrán mayor dispersión. La mayoría de las especies de amebas tienen tamaños en el intervalo de 6 a 15 μm de aquí que su distribución sea cosmopolita, sobre todo en cuerpos de agua, tales como ríos, estanques, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de aguas residuales, corrientes subterráneas e incluso en agua potable y agua embotellada (Rivera *et al.*, 1979; 1987; 1988; 1994).

b) Importancia Biomédica

Dentro del grupo de amebas de vida libre, se ha encontrado un reducido número de especies que tienen la capacidad de invadir animales, produciéndoles severas infecciones en la piel, los ojos y el sistema nervioso, entre otras; los principales géneros patógenos son *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* y *Balamuthia* (John, 1993; Visvesvara *et al.*, 1990 (Tabla 1).

A estas amebas también se les ha llamado anfizóicas (gr, *amphi*, que significa "de ambos lados") porque además de vivir en el ambiente pueden parasitar a otros organismos (Rondanelli, 1987).

Tabla 1. Animales susceptibles a la infección por amebas. (Tomada de John, 1993)

Grupo Animal	Tejido	Ameba	Reporte de:
MOLUSCOS			
Ostra	Visceras	<i>Hartmannella tahitiensis</i>	Tahití
Caracol de jardín	Pie, manto, pared intestinal y tentáculos	<i>H. biparia</i> y <i>H. quadriparia</i>	Estados Unidos
CRUSTÁCEOS			
Langosta	Sangre y exoesqueleto	<i>Paramoeba perniciosa</i>	Estados Unidos
Cangrejo	Músculo cardíaco, Hepatopáncreas, sangre y esqueleto	<i>P. perniciosa</i>	Estados Unidos
PECES			
Trucha y pez Dorado	Riñones, hígado, meninges, agallas, vejiga, bazo y sangre	<i>Naegleria</i> sp., <i>Vahlkampfia</i> sp., <i>Acanthamoeba</i> sp., y <i>Vahlkampfia</i> sp.,	Estados Unidos
REPTILES			
Boa	Cerebro	<i>Acanthamoeba</i> sp. y <i>Hartmannella</i> sp.	Alemania
AVES			
Pavo y pichones	Tráquea e intestino	<i>H. vermiformis</i> , <i>V. enterica</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Rep. Checa
MAMÍFEROS			
Mandril	Cerebro	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	Estados Unidos
Toro	Pulmón y prepucio	<i>A. polyphaga</i> y <i>Hartmannella</i> sp.	Rep. Checa
Castor	Riñones, hígado y Músculo	<i>Hartmannella</i> sp.	Suiza
Vaca	Vagina	<i>A. polyphaga</i>	Rep. Checa
Perro	Corazón, hígado, pulmón, páncreas, bronquios, cerebro, riñón	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> y <i>H. vermiformis</i>	Estados Unidos
Conejo	Hígado	<i>A. polyphaga</i>	Rep. Checa
Visón de agua	Pulmón	<i>Acanthamoeba</i> sp.	India

Los géneros y especies de AVL que se ha encontrado infectan a humanos son: *Acanthamoeba* spp, *Hartmannella vermiformis*, *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* (John, 1993) (Tabla 2).

En el caso del género *Acanthamoeba* son varias las especies que presentan patogenicidad al humano. Se comportan como organismos oportunistas porque incluso pueden habitar en

las fosas nasales de humanos en condiciones normales de salud (Červa *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1986). Para que *Acanthamoeba* logre infectar se deben conjugar factores de predisposición como: embarazo, alcoholismo, quimioterapia, radioterapia, diálisis, trasplantes, etc., y/o asociación con enfermedades como: síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), diabetes mellitus, neumonías, otitis, faringitis, cirrosis, hepatitis, así como también en pacientes inmunosuprimidos (Martínez y Janitschke, 1985).

Tabla 2. Infecciones humanas causadas por amebas de vida libre (Tomada de John, 1993; Modificada).

Especies	Infección en el SNC	Infección ocular	Otros tejidos
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	X		Nódulos linfáticos Adrenales, piel (ulceraciones), tiroides y senos nasales.
<i>A. castellanii</i>	X	X	Pulmón (neumonía), próstata, hueso, músculo, y piel.
<i>A. culbertsoni</i>	X	X	Hígado, bazo, útero y piel
<i>A. hatchetti</i>		X	
<i>A. palestinensis</i>	X		
<i>A. polyphaga</i>	X	X	
<i>A. rhyodes</i>	X	X	
<i>Hartmannella vermiformis</i>	X		
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	X		Pulmón
<i>Naegleria fowleri</i>	X		

SNC: Sistema Nervioso Central

El principal padecimiento causado por este género es a nivel del sistema nervioso central (SNC) donde provoca la enfermedad llamada encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) o acantamebiosis; esta patología presenta un largo curso clínico con signos y síntomas neurológicos que dependen del sitio dañado; la vía de entrada de estos organismos puede ser a través de la piel o de las mucosas y por aspiración nasal de agua o aire contaminados. Además el género *Acanthamoeba* produce queratitis ocular en usuarios de lentes de contacto independientemente de su estado de salud (Kilvington *et al.*, 1991a; Martínez 1983; 1985).

Desde el inicio de la década de los setenta se reportó a la ameba del género *Hartmannella* como probable causante de abscesos en el cerebro de un paciente con la enfermedad de Hodgkin (Jager y Stamm, 1972). En México se reportó un caso asociado a una meningoencefalitis en un joven del Estado de Puebla, por que este género ha sido asociado con casos de MEAP, pero no se ha demostrado claramente su patogenicidad en humanos (Centeno *et al.*, 1996). Asimismo se ha observado una relación de esta ameba con bacterias del género *Legionella* en pacientes con enfermedades respiratorias (Wadowsky *et al.*, 1991).

Balamuthia mandrillaris ha sido clasificada recientemente después que se aisló del cerebro de un mandril muerto de meningoencefalitis. Al ser diferente a las amebas antes conocidas se creó un nuevo género, *Balamuthia* con una sola especie *B. mandrillaris* (Visvesvara *et al.*, 1993). Esta especie ha sido identificada en 35 casos de encefalitis amebiana en humanos (Griesemer *et al.*, 1994).

2. *Naegleria fowleri*

a) Descripción y clasificación del género

Los organismos del género *Naegleria* (Figura 1) son pequeños y asexuales, presentan un trofozoito de tamaño entre 15 y 28 μm (Marciano-Cabral, 1988). El desplazamiento en el agua de todas las especies es muy rápido debido a la formación de lobópodos eruptivos hialinos (John, 1982; John y Howard, 1996).

El quiste de las amebas del género *Naegleria* (Figura 2) tiene forma esférica y tamaño entre 8.4 a 22.9 μm con una promedio de 15.6 μm . Al microscopio de contraste de fases son fácilmente visibles uno o varios poros sobre la pared del quiste, los cuales son más conspicuos en quistes vacíos que en quiste maduros o prequistes (John *et al.*, 1985).

La fase temporal ameboflagelar (Figura 3) es una característica notable del género; en el laboratorio se logra hacer visible cuando las amebas son puestas en contacto con agua destilada a temperatura de 37 °C, después de 60 o 90 minutos, presentan uno o dos flagelos en uno de los extremos del trofozoito y el desplazamiento de la ameba por movimiento flagelar se acelera. Se considera que este flagelo es muy importante para su desplazamiento tanto en la búsqueda de alimento, como para invadir el cuerpo de una persona (Marciano-Cabral, 1988).

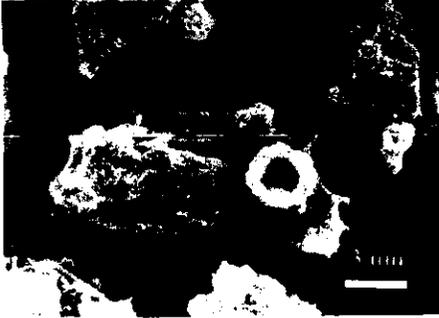


Figura 1. Micrografía electrónica de un trofozoito de *Naegleria fowleri* (Tomada de John, 1993).

Figura 2. Micrografía electrónica del quiste de *N. fowleri* (Cepa KUL), mostrando un solo poro (Tomada de John, 1993).

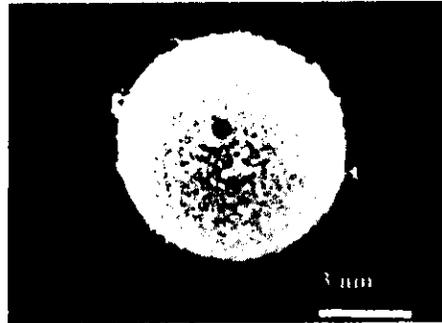


Figura 3. Micrografía electrónica de la forma ameboflagelar de *N. fowleri* (Cepa KUL), en este caso presentando dos flagelos (Tomada de John, 1993).

Tabla 3. Clasificación del género *Naegleria* (Lee *et al.*, 1985; Page, 1988).

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopodea
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Schizopyrenida
Familia	Vahlkampfiidae
Género	<i>Naegleria</i>
Especies	<i>gruberi</i> <i>fowleri</i> <i>jadini</i> <i>lovaniensis</i> <i>australiensis australiensis</i> <i>australiensis italica</i>

Por más de 60 años, los autores consideraron a *N. gruberi* como la única especie en el género hasta el descubrimiento de un caso de meningoencefalitis, en una persona, provocado por amebas termófilas (Kyle y Noblet, 1987), lo que condujo a la necesidad de reconocer especies adicionales en el género con el fin de distinguir las especies virulentas de otras termófilas no virulentas al humano (Marciano-Cabral y Fulford, 1986). En la Tabla 4 se muestran las principales características de las cinco especies y de dos subespecie del género.

Tabla 4. Especies de *Naegleria* (Tomada de Page, 1988).

Características	<i>N. gruberi</i>	<i>N. fowleri</i>	<i>N. jadini</i>	<i>N. lovaniensis</i>	<i>N. australiensis australiensis</i>	<i>N. australiensis italica</i>
Crecimiento a						
20 °C	+		+			
30 °C	+	+	+	+	+	+
37 °C	V	+	-	+	+	+
42 °C	-	+	-	+	+	+
45 °C	-	+	-	+	-	-
Patogenicidad en:						
Ratones	-	+	-	-	+	+(*)
Humanos	-	+	-	-	-	-
Diámetro del quiste (µm)	¹ cepas 10-16	7-15	13.9	cepas 9.6- 13	11.6	

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo; V, resultado variable; (*) Presentó mayor virulencia que *N. australiensis australiensis*. 1, medida tomada solo en cepas de referencia.

b) Ciclo de vida

Los organismos del género *Naegleria* presenta tres fases durante su ciclo de vida: trofozoito, quiste y temporalmente un estado flagelado. *Naegleria fowleri* (Figura 1), son amebas termófilas, que toleran temperaturas de 40 a 45 °C, Es el trofozoito la fase invasiva, la infección se adquiere por aspiración nasal del agua donde se encuentra estos organismos. Se considera que el quiste y el estado flagelado también podría entrar por la nariz de un nadador tan fácilmente como un trofozoito. En la mucosa nasal, los quistes o formas flageladas pueden transformarse rápidamente a trofozoitos (Figura 4), para iniciar la infección, aunque en los tejidos o fluidos cerebrospinales del huésped solo se han encontrado trofozoitos (John, 1993).

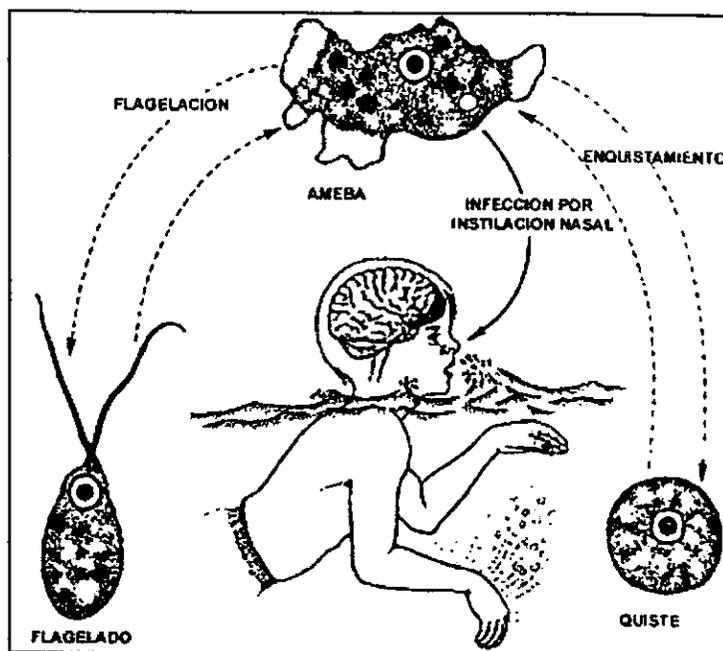


Figura 4. Ciclo de vida de *N.fowleri* e infección en humanos.

c) Patogenicidad

El nombre de *Naegleria fowleri*, fue puesto en honor de Malcom Fowler, quien fue el primero en describir la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) y aisló la ameba del líquido cefalorraquídeo del primer caso reportado en Australia en 1965 (Martínez, 1985).

Es importante resaltar que estas amebas se alimentan de bacterias principalmente pero su capacidad de invadir y consumir tejido animal y sobretodo que la especie humana sea uno de sus huéspedes, sea el motivo principal por tratar de conocer sus mecanismos de patogenicidad (Gálvez *et al.*, 1993).

Se considera que el inicio de la invasión por *N. fowleri* es igual al de *Entamoeba histolytica*, y se efectúa por medio de glicoproteínas de superficie (lectinas) que reconocen carbohidratos en la célula blanco, produciéndose una adhesión a las células epiteliales y nerviosas del huésped (Marciano-Cabral *et al.*, 1982).

Asimismo, los pseudópodos de estos organismos promueven la penetración e invasión por la dinámica que poseen hacia los tejidos y mucosas del huésped; en el caso de *N. fowleri*, presenta estructuras semejantes a bocas, llamadas "amebostomas", las que le permiten a la ameba que empiece el procesamiento de su sustrato de manera mecánica o lo pueda fagocitar de manera completa como lo hace con los eritrocitos (John *et al.*, 1985).

La producción de enzimas de degradación y otras proteínas líticas es otro mecanismo que poseen las AVL para invadir al huésped. El efecto citopático de *N. fowleri* sobre cultivos celulares de mamíferos se debe a diferentes fosfolipasas como: la fosfolipasa A, la lisofosfolipasa, y la esfingomielinasa (Cursons y Brown, 1978; Hysmith y Franson, 1982 a, b). Se han reportado diferencias en la actividad de las fosfolipasas de especies patógenas y no patógenas de *Naegleria* (Nerad y Daggett, 1979), teniendo mayor actividad las proteínas de las primeras. Los fosfolípidos que constituyen la mielina humana son degradados con sólo el sobrenadante del medio donde es cultivada *N. fowleri*, pues las neuroaminidasas presentes en el medio, hidrolizan mielina y mucina humana (Eisen y Franson, 1987). Estas enzimas que son capaces de hidrolizar glicolípidos y fosfolípidos de la mielina en pruebas *in vitro*, son las responsables de la desmielinización masiva que ocurre en la MEAP humana (Duma *et al.*, 1971; Chang, 1979). Existen otras enzimas, que se considera están relacionadas con la patogenicidad de estos organismos y que aparecen en los extractos de *N. fowleri*: hidrolasas, fosfatasa ácida, varias glicosidasas (Lowrey y McLaughlin, 1985; Olomu *et al.*, 1986; Das *et al.*, 1987; Marciano-Cabral *et al.*, 1987) y elastasa (Ferrante y Bates, 1988).

En el caso de las infecciones por *Naegleria fowleri*, el curso clínico del paciente es dramático; una vez que ésta invade la mucosa nasal y la placa cribiforme viaja a través de los nervios olfatorios y llega hasta el cerebro donde provoca inflamación y causa destrucción masiva del tejido, a esta infección se le ha nombrado Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) y puede ser de carácter clínico agudo o sobreagudo (Mendiola *et al.*, 1991).

El período de incubación de *N. fowleri* varía de dos días a tres semanas dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia del organismo invasor (Hu, *et al.*, 1992). La aspiración de agua o aire que contiene estas amebas les permite alcanzar el epitelio olfatorio de la mucosa pituitaria y penetrar a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose así, la ruta de diseminación de las amebas a otras partes del encéfalo (Martínez y Amado-Ledo, 1979).

La mayoría de los pacientes experimentan severos dolores de cabeza, fiebre, anorexia, náusea y vómito, seguidos de irritación meníngea. También se han encontrado alteraciones del comportamiento como letargo, somnolencia, confusión, irritabilidad, sopor, inquietud y alucinaciones; el estado de coma es la fase final antes de la muerte del paciente (Martínez y Visvesvara, 1997).

En la tabla 5 se presentan los síntomas y/o signos en 15 pacientes con MEAP causada por *Naegleria fowleri*. Sobresale en este tipo de infección que en la mayoría de los pacientes

tienen como antecedente que son personas sanas y jóvenes relacionados con la natación como actividad durante la época calurosa (De Jonckheere, 1978, 1979; Martínez y Amado-Ledo, 1979).

Tabla 5. Síntomas y/o signos en 15 pacientes con MEAP (Tomada de Martínez y Visvesvara, 1997. Modificada).

Síntomas/signos	No. de pacientes	Porcentaje %
Cefalea	15	100
Anorexia; náusea; vómito	14	94
Fiebre (39-40 °C)	14	94
Irritación meníngea	13	86
Anormalidades mentales y cambio de personalidad*	10	66
Coma (inicial o inmediatamente después del ingreso Hospitalario)	4	26
Trastornos visuales**	2	26
Convulsiones	2	13
Parosmia	2	13
Ageusia	2	13
Ataxia cerebral	1	6
Hemiparesia (terminal)	1	6
Afasia	1	6
Diabetes insipidus (terminal)	1	6

* Letargia, somnolencia, confusión, irritabilidad, intranquilidad y alucinaciones.

**Diplopia, visión borrosa y parálisis de nervios craneales.

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana, sin embargo en el líquido cefalorraquídeo el exudado purulento es escaso o está ausente y no pueden aislarse ni teñirse bacterias ni hongos, asimismo el diagnóstico se confirma con el aislamiento de *N. fowleri* del líquido cerebroespinal o del tejido de biopsia cerebral (Barnett *et al.*, 1996; Lalitha *et al.*, 1985).

d) Tratamiento contra la invasión de *N. fowleri*

No existe un tratamiento completamente satisfactorio contra la MEAP principalmente porque el diagnóstico se realiza generalmente *post mortem*, y por la rapidez con que avanza la infección es difícil evaluar su evolución con diferentes antibióticos (Reilly *et al.*, 1993a; Young y Lowrey, 1989). En distintos estudios que se realizaron en ratones infectados con *N. fowleri*; resultó que una combinación de anfotericina B con sulfadiazina y la anfotericina B sola, eran las drogas más eficientes sobre otros antibióticos como sulfadiazina y la emetina contra estas amebas (Martínez *et al.*, 1977). La anfotericina B afecta el movimiento de las amebas e inhibe su crecimiento; al entrar en contacto con el

fármaco, se observa como los organismos pasan de una fase de plena actividad a una de inmovilidad; los pseudópodos normalmente encontrados en la fase de trofozoito se retraen y las amebas adquieren una forma redonda (Schuster y Rechthano, 1975). Posteriormente las vacuolas digestivas desaparecen y los organelos y demás estructuras celulares se lisan hasta que finalmente la masa celular pierde sus características y la ameba se destruye (Rondanelli, 1987; Scaglia *et al.*, 1998). Se sabe de cinco sobrevivientes que fueron tratados con anfotericina B aplicada por vía intravenosa e intratecal. Cuatro de los sobrevivientes fueron niños de Australia (Anderson y Jamienson, 1972), Gran Bretaña (Apley *et al.*, 1970), Estados Unidos (Seidel *et al.*, 1982) y México (Rodríguez-Pérez, 1984). Al paciente de los Estados Unidos también le suministraron miconazol por vía parenteral y rifampicina por vía oral. Además se considera que la anfotericina B es efectiva aún después de ser aplicada con un retraso de 48-72 horas después de iniciada la infección. Un inconveniente en el uso de la anfotericina B es su elevada toxicidad, sobre todo si se aplica en grandes dosis (1-1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa o intratecal). Asimismo, se han utilizado derivados de la anfotericina B para disminuir el nivel de toxicidad, o modificando su estructura en un grupo metil-éster pero aunque es mucho menos tóxico también su potencial contra *N. fowleri* es menor (Ferrante, 1982; Thong y Ferrante, 1987).

e) Identificación (antecedentes)

Félix Dujardin en 1841 fue el primero en observar y reportar a las amebas de vida libre, agruparlas y nombrarlas *Amoeba limax* (Rivera *et al.*, 1991), pero sólo se les conocía como habitantes inoocuos del ambiente. Sin embargo Culbertson en 1958 encuentra un efecto citopático de este tipo de amebas en cultivos celulares de riñón de mono, y declara que las amebas tienen un potencial patógeno. Los primeros casos en que se determinó como agente infectante a *N. fowleri* se reportaron en Australia, donde se aisló y tipificó por Fowler (Fowler y Carter, 1965). Poco después, Butt reportó en Florida E.U., tres casos más donde también los afectados fallecen (Butt, 1968). La sintomatología de estos casos sentó las bases de las características clínicas y patológicas de la enfermedad y su agente causal. No obstante los primeros casos de meningoencefalitis en humanos debidamente comprobados provienen de hace apenas unas décadas, porque anteriormente, se creía que todos los casos comprobados de MEAP se debían a *N. fowleri* (Carter, 1970). Posteriormente, se reconocen casos por amebas del género *Acanthamoeba* (Jager y Stamm, 1972; Robert y Rorke 1973). A medida que se fueron conociendo más los aspectos de las infecciones, se encontraron diferencias que llevaron a proponer el término de encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) provocada por las amebas del género *Acanthamoeba* (Martínez y Amado-Ledo, 1979) para diferenciarla de la MEAP debida a *Naegleria fowleri*.

Los estudios de AVL en México se iniciaron por Rivera y colaboradores (Rivera y Paz, 1978; Rivera *et al.*, 1984a, b), quienes reportaron amebas del género *Naegleria* en reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México y a *N. fowleri* de agua de piscinas de la misma ciudad (Rivera *et al.*, 1983).

Se han reconocido hasta el momento en México 10 casos de MEAP *post mortem* (Valenzuela *et al.*, 1984; López-Corella *et al.*, 1989; Lares-Villa *et al.*, 1993) y dos más mientras los pacientes se hallaban vivos (Rodríguez-Pérez, 1984).

f) Técnicas de identificación de AVL.

Para la identificación de estas amebas se cuenta con diversos métodos basados en la morfología, bioquímica, fisiología y patogenicidad de tales organismos. Para la identificación morfológica se utilizan las claves taxonómicas de Page (1988). Pero la confiabilidad de este método siempre tiene que ir apoyado o confirmado por otras técnicas de carácter experimental como pruebas bioquímicas que permitan establecer un diagnóstico más preciso, sobre todo para llegar a nivel de especie. Para su identificación, una vez que se ha aislado a la ameba y axenizado se realizan las siguientes pruebas: tolerancia a la temperatura elevada, prueba de transformación ameboflagelar y prueba de patogenicidad en ratones. Sin embargo todo este procedimiento requiere además de un trabajo intensivo, demasiado tiempo si se trata de salvar la vida de una persona. Por lo que es urgente desarrollar otras técnicas que den mayor velocidad y precisión en la identificación del agente causante de la infección y así aumentar la posibilidad de salvar a la persona infectada.

Técnicas inmunológicas

De Jonckheere adaptó la técnica de inmunofluorescencia indirecta; usando antisueros obtenidos a partir de cepas de referencia. (De Jonckheere *et al.* 1977; Williaerte *et al.*, 1974). Marciano-Cabral también inició los estudios de identificación de las amebas por la prueba de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a la Enzima) usando las placa ELISA microtituladas, con una concentración de 20 mg/ml de antígenos ameboides, dilución de suero adecuada, un conjugado enzimático y peróxido de hidrógeno al 10%, con un amortiguador de sustrato que contenga ortofenilendiamina como enzima sustrato (Marciano-Cabral *et al.*, 1987a).

Técnica de isoelectroenfoque

A partir de la década de los 80's, los patrones isoenzimáticos (zimogramas) fueron muy utilizados de acuerdo a lo diseñado por De Jonckheere (1982) para corroborar la identificación de las amebas con potencial patógeno. Esta técnica se basa en la comparación de los zimogramas de las amebas a identificar con cepas de referencia. El isoelectroenfoque consiste en separar los diferentes componentes de una enzima sobre un sustrato de agarosa con un anfolito, al hacer pasar una corriente eléctrica de alto voltaje sobre ese sustrato y una muestra extracto del organismo problema, por las propiedades del anfolito se genera un gradiente de pH sobre la agarosa y las proteínas de la ameba migran hasta alcanzar su punto isoelectrónico. Con un revelador enzimático adecuado se pueden hacer visibles las bandas de las enzimas que responden a un sustrato específico, por lo que pueden identificarse aquellas enzimas que sean útiles para la identificación amebiana (Pernin *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1992).

Identificación por el ADN.

La técnica de PCR (siglas en el idioma inglés de "polymerase chain reaction"), es un método enzimático que realiza múltiples copias de un segmento de ADN preseleccionado; para realizar esta amplificación son necesarios dos oligodesoxinucleótidos sintéticos (forward y reverse), la enzima ADN polimerasa termoestable y los cuatro desoxiribonucleosidos trifosfatados activos en un ADN templado y una solución amortiguadora para la correcta realización de la reacción (Arnheim y Erlich, 1992).

Los componentes esenciales de una mezcla para la reacción son la *Taq* DNA polimerasa, dos oligonucleótidos que serán los iniciadores (primers), los cuatro desoxinucleótidos: guanina, citocina, timina y adenina (G,C,T,A) trifosfatados y el fragmento de ADN preseleccionado que se multiplicará. La reacción de PCR consta de tres etapas: 1. El ADN por una elevación de la temperatura se abre o se desnaturaliza; 2. Los iniciadores se alinean en el gen o fracción a amplificar; y 3. Con los desoxiribonucleósidos trifosfatos activos que se van añadiendo a los iniciadores se extiende el lado contrario de la cadena de ADN, de esta manera comenzará otro ciclo. Los iniciadores se extenderán a través de la secuencia pre-seleccionada con la enzima polimerasa de ADN en presencia de los desoxinucleótidos trifosfatados libres, por lo que el material preseleccionado se duplica, la repetición de este proceso varias veces da como resultado en un incremento exponencial de la cantidad (o la concentración) del ADN preseleccionado (Arnheim y Erlich, 1992; Gorospe *et al.*, 1996).

A partir del desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa en 1983 que vino a ser el mayor adelanto en los estudios de biología molecular hasta la fecha, se abrieron grandes expectativas en los estudios desde forenses hasta ecológicos, encontrándose un lugar especial en la investigación de diagnóstico médico/clínico (Steffan y Atlas, 1991). En el caso de los análisis clínicos para la detección de organismos causales de enfermedades han encontrado en PCR una herramienta práctica, rápida y segura para la atención pronta y oportuna del paciente que presente determinada infección, con la condición que ya se hayan realizado estudios del ADN del organismo causante, encontrando la o las secuencias específicas de dicho organismo que por medio del PCR se amplificará a los de su misma especie. De la misma manera la técnica se ha aplicó con organismos del ambiente, para probar de forma rápida su existencia en determinado ambiente ya sea por interés ecológico o epidemiológico (Kilvington y Beeching, 1995a).

Los conocimientos sobre el ADN de *Naegleria fowleri* se iniciaron con base a los cortes por enzimas de restricción con la creación de los llamados "mapas del genoma" (RFLP por siglas en inglés; "restriction fragment length polymorphism") (Pelandakis *et al.*, 1988), del ADN mitocondrial tanto para su clasificación como para las divergencias que presenta el género *Naegleria* (Clark, *et al.*, 1989), como también en ADN nuclear en torno a lo relacionado a la dispersión de *N. fowleri* en el mundo (De Jonckheere, 1988; Pernin y De Jonckheere, 1992), pero en todos estos estudios sobresalen los relacionados a la detección o identificación del organismo en el aspecto epidemiológicos (De Jonckheere, *et al.*, 1992; Kilvington y Beeching, 1995a; McLaughlin, *et al.*, 1988; Wessbery *et al.*, 1995). Con la

aparición de la técnica de PCR se incrementaron los trabajos para detectar a *Naegleria fowleri* del ambiente (Kilvington y Beeching, 1995b; McLaughlin *et al.*, 1991; Sparangano, 1993a y b; Sparangano *et al.*, 1994; Van Belkum *et al.*, 1992, 1993).

De esta manera el desarrollo e implementación de esta técnica es importante porque pueden determinar la sobrevivencia de un paciente: al permitir el diagnóstico oportuno de la infección por amebas de vida libre, así como identificar de forma precisa a la especie amebiana causante de la infección, para que se pueda dar inicio a la terapia médica adecuada ya que como se ha mencionado la infección puede causar la muerte en el lapso de una semana.

Por otro lado, también es muy importante detectar aquellos sitios, principalmente los acuáticos, donde se sospeche que el paciente obtuvo la infección. Estos organismos potencialmente patógenos los encontraremos con mayor facilidad en lugares húmedos y con temperaturas elevadas ya que esto favorece su crecimiento y proliferación. Si estos lugares son centros de interés turístico esto adquiere mayor importancia porque un mayor número de personas entran en contacto con el agua y si no ignoran el peligro potencial del lugar podrán tomar las medidas adecuadas para evitar una infección; asimismo, los dueños del lugar podrán garantizar la seguridad de los visitantes. En el caso de los ambientes naturales el problema es más difícil de solucionar porque al saberse que en estos lugares se pueden detectar amebas potencialmente patógenas se cuenta con un punto de partida para ayudar al diagnóstico. Para la identificación correcta hasta el nivel de especie de las amebas patógenas, ya sea de muestras del ambiente o de muestras clínicas se requiere personal especializado y con experiencia. En nuestro país los grupos que trabajan con estos organismos son escasos. Para un técnico de laboratorio y aún para un microbiólogo es muy difícil identificar hasta que especie pertenecen estos organismos, sobre todo si estos protozoos se encuentran o se aíslan en cantidades poco abundantes pues con frecuencia, estas amebas se confunden con facilidad con artefactos o células de otro tipo para alguien que no esté bien capacitado. Es por ello que las técnicas bioquímicas desarrolladas en las últimas décadas han permitido una mayor efectividad para identificar en un tiempo corto al organismo causante de la infección.

3. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

a) Estado de San Luis Potosí

El estado de San Luis Potosí está situado en la porción central del país, tiene una superficie de 63,068 km² (3.2 % del territorio nacional), ocupando el decimoquinto lugar en extensión territorial entre las entidades que conforman la república. Colinda al norte con Coahuila, al noreste con Nuevo León y Tamaulipas, al este con Veracruz, al sur con Guanajuato, Querétaro e Hidalgo, al sudoeste con Jalisco y al oeste con Zacatecas. Se distinguen en la entidad las siguientes regiones: a) La Huasteca, que comprende parte de la planicie costera del Golfo y la Sierra Madre Oriental; b) La Altiplanicie Meridional, que incluye la llanura de río Verde, formada por gruesos depósitos aluviales y las serranías del

sur de topografía muy accidentada; c) y la Altiplanicie Septentrional; está última es la más extensa, pues abarca las dos terceras partes de la superficie de la entidad, esta conformada por la zona boreocentral y la planicie del occidente, separadas entre sí por la Sierra de Catorce. A un lado de las sierras de San Miguelito y de Mezquitic está el valle irregular de origen lacustre donde se asienta la capital; y en la otra vertiente, el Plan de Arriaga (SSP-INEGI 1985).

Los ríos Santa María y Verde se unen al entrar a la Huasteca, formando el río Tampico; al que confluyen el río Frío y el río Valles, provenientes a su vez del río Salto y el río Mesillas; todas estas afluencias originan el río Tamuín y éste, al verter en el río Moctezuma, cambia su nombre por el de río Pánuco. Las caídas de agua más notables en este sistema son las del Salto de Tanloquen y la de Micos.

En cuanto a la vegetación la Huasteca predominan los bosques tropicales, y en las otras regiones del estado, el matorral desértico y submontañoso.

El estado de SLP comprende partes de la altiplanicie; la Sierra Madre Oriental y la planicie costera del Golfo de México. El Trópico de Cáncer lo atraviesa en la zona norte por lo que los municipios al norte de esta línea quedan dentro de la zona templada y los que están al sur en la zona intertropical.

La temperatura del estado varía principalmente a causa de la forma del relieve, la vegetación y la altura sobre el nivel del mar. La temperatura media anual en la Cd. de San Luis Potosí es de 17.9 °C y en Cd. Valles es de 24.6 °C. Los vientos alisios cálidos y húmedos, vienen del norte del Golfo de México y entran a nuestro país por la planicie costera, después se encuentran la Sierra Madre Oriental con la que chocan, por lo que se producen abundantes lluvias. Después de atravesar la Sierra Madre Oriental los vientos se vuelven secos.

El presente estudio se realizó principalmente en la región llamada:

b) Huasteca Potosina

Se escogió la región de la Huasteca Potosina para la realización de este proyecto ya que desde 1990 se han realizado estudios en los cuerpos naturales de agua de esta zona debido a su clima tropical húmedo que permite que dichos cuerpos de agua alcancen temperaturas que van de los 26 °C a los 40 °C en invierno y de 30 °C a 42 °C en el verano. Este ambiente acuático cálido favorece enormemente la proliferación de las amebas de vida libre termófilas -dentro de las cuales se hallan todas las patógenas- que soportan temperaturas hasta de 45 °C como *Naegleria fowleri* y de 42 °C como *Naegleria australiensis* (Bonilla *et al.*, 1999).

Se conoce como "Huasteca" a una amplia región fértil del noreste de nuestro país que comprende porciones de las entidades de: Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo y San Luis Potosí, todas incluidas en la porción limitada por la costa del Golfo de México al este y las

coordenadas 24° al Norte, 101° al Oeste y 20° al Sur.

La Huasteca Potosina se encuentra entre los paralelos 21° 10' y 22° 30' N, los meridianos 98° 30' y 99° 20' W. Corresponde a la vertiente externa septentrional del plano costero del Golfo y a la región terminal norte de la región neotropical en la Sierra Madre Oriental. Destacan en esta zona las sierras de San Martín, Tamazunchale, Xilitla, Tambaque, Nicolás Pérez y Tanchipa. Pertenecen enteramente a la zona de drenaje del río Pánuco y sus afluentes. En esta zona se encuentran tantos ríos caudalosos, como arroyos permanentes y manantiales. Además se forman numerosas lagunas en los municipios de Tamuín, Tancuayalab y Tanquián.

La Huasteca Potosina tiene gran importancia nacional desde los puntos de vista históricos, políticos, económicos, y en cuanto a recursos naturales sobresaliendo por los agropecuarios, pesqueros y turísticos por su gran variedad y riqueza. En ella se localiza además la zona petrolífera del estado, habiendo explotaciones de importancia en Ébano y en El Limón perteneciente este último lugar al municipio de Tamuín. Hay también yacimientos de carbón de piedra en Xilitla, Axtla de Terrazas y Tancanhuitz de Santos.

En el norte de la Huasteca se ubica parte del proyecto del sistema de riego Pujal Coy, uno de los más grandes de Iberoamérica. Sin embargo, a pesar de la importancia de la región, los estudios ecológicos sobre la misma no son abundantes y los enfoques multidisciplinarios faltan para mayor conocimiento y aprovechamiento de la zona.

Desde el punto de vista biológico, esta región es de gran importancia porque establece el límite norte de la zona cálido-húmeda en el continente americano. Un extenso grupo de plantas, animales y microorganismos de estas afinidades ecológicas encuentran aquí el margen de las posibilidades de existencia. La variedad topográfica de la región de la Huasteca es la causa de encontrar una amplia gama de condiciones climáticas.

Clima

En la Huasteca Potosina se presentan notables contrastes climáticos; por una parte una planicie tropical cálida y baja, con invierno seco y lluvias en verano, por otra una sierra alta y de clima templado, con lluvias todo el año.

De acuerdo con la carta estatal de climas de la SPP (1985), el clima varía desde cálidos del tipo A de Köppen, que se encuentran en el plano costero, con aumento de la humedad en la medida que se acerca la Sierra Madre hasta la zona más seca, (Awo), se encuentra al este de Tamuín. Existe un área más húmeda, (Aw1), entre la localidad anterior y Cd. Valles. El clima, (Aw2), presenta áreas discontinuas; una, al oeste de Cd. Valles, siguiendo el contorno topográfico, en forma similar a las dos anteriores; y otra cerca de Santa Catarina.

Los climas semicálidos se encuentran al pie de las laderas inferiores de la Sierra Madre, desde donde empieza a acentuarse la humedad. El clima (A) c (mw) forma una amplia

franja, que corre de NO a SE, ocupando la mayor parte de las serranías entre el Salto y Tamazunchale. Existe además un área semicálida de alta precipitación, (A) Ctm, que se localiza al sur, cerca de los límites con Querétaro e Hidalgo entre Xilitla y Tamazunchale. La zona semicálida menos húmeda, (A) Cw1 corresponde a la parte más baja de la Sierra Madre Oriental, y se localiza, a lo largo de esta cadena montañosa, al norte de Santa Catarina. En algunas zonas de sombra orográfica de la Sierra, se pueden encontrar manchones aislados de (A) Cwo w (García, 1988).

Vegetación

La vegetación es de bosque tropical con mayor exuberancia en la sierra y decreciendo en la llanura costera donde predomina el bosque tropical espinoso. La vegetación de sabana se alterna con bosques de árboles corpulentos, arbustos y lianas (Puing, 1976; Rzedowski, 1978).

c) Descripción de los sitios de estudio

A continuación se describen los lugares donde se localizan los cuerpos de agua recreacionales muestreados en este estudio (Dirección Estatal de Turismo del Estado de San Luis Potosí, 1993), (Figura 5).

Ciudad Valles

Ciudad Valles está en plena Huasteca Potosina, a 87 msnm con clima cálido y vegetación abundante. Se encuentra a 133 Km de Río Verde y 265 de la Cd. de San Luis Potosí. Es la segunda ciudad en importancia del estado; fue fundada el 25 de julio de 1533 por Nuño de Guzmán con el nombre de Villa de Santiago de los Valles de Oxitipa y es un importante centro comercial, agrícola y ganadero. Entre sus actividades industriales está la producción de azúcar, alcohol y fibracel entre otras. El municipio es regado por los ríos Valles y Tambaón; cuenta con numerosos manantiales, como "El Bañito" situado a 12 Km sobre la carretera a Tamazunchale. En esta ciudad se localizan las piscinas de El Bañito.

Taninul

El Municipio de Tamuín se encuentra a 15 Km de Cd. Valles por la carretera No. 70 a Tampico y 2 Km más de desviación pavimentada, donde se encuentra el Hotel Balneario de Taninul, con un manantial de aguas sulfurosas y alcalinas, con una temperatura media de 42 °C; estas aguas son tradicionalmente recomendadas para el tratamiento del reumatismo, neuralgia y otras enfermedades de la piel. En una alberca circula el agua del manantial, que constantemente está brotando.

Xilitla

El pueblo y cabecera municipal de Xilitla está asentado en lo más abrupto de la sierra del mismo nombre, se encuentra a 41 Km de Tancanhuitz a 1055 msnm, su clima es templado

y lluvioso todo el año. Su nombre significa en náhuatl “lugar de cozole”, esta última palabra designa una variedad de cangrejo que abunda en esta zona. Está situado en la sierra, a media ladera de altas montañas y con una vista hacia la profunda cañada por donde escurre el río Tancuilín; por un camino de terracería se llega a “Las Pozas”, lugar extraño por su arquitectura pues semeja estar integrada a la naturaleza. Abarca un cerro y un valle , llenos de vegetación y cascadas naturales donde se encuentran un conjunto de pozas artificiales creadas para nadar en ellas y que desembocan en una gran cascada, con temperaturas superiores a los 18 °C en el agua.

Gogorrón

El municipio Villa de los Reyes fue fundado en 1570 con el nombre de Valle de San Francisco, hoy debe su nombre a Julián de los Reyes, ex gobernador del estado. El pueblo se extiende en un fértil valle. A 9 Km de Villa de los Reyes está el Centro Vacacional Gogorrón, que cuenta con aguas termales de hasta 42°C; sus cualidades para el tratamiento de padecimientos reumáticos y artríticos son reconocidos internacionalmente, además posee cabañas, baños romanos, piscinas, chapoteaderos, etc.

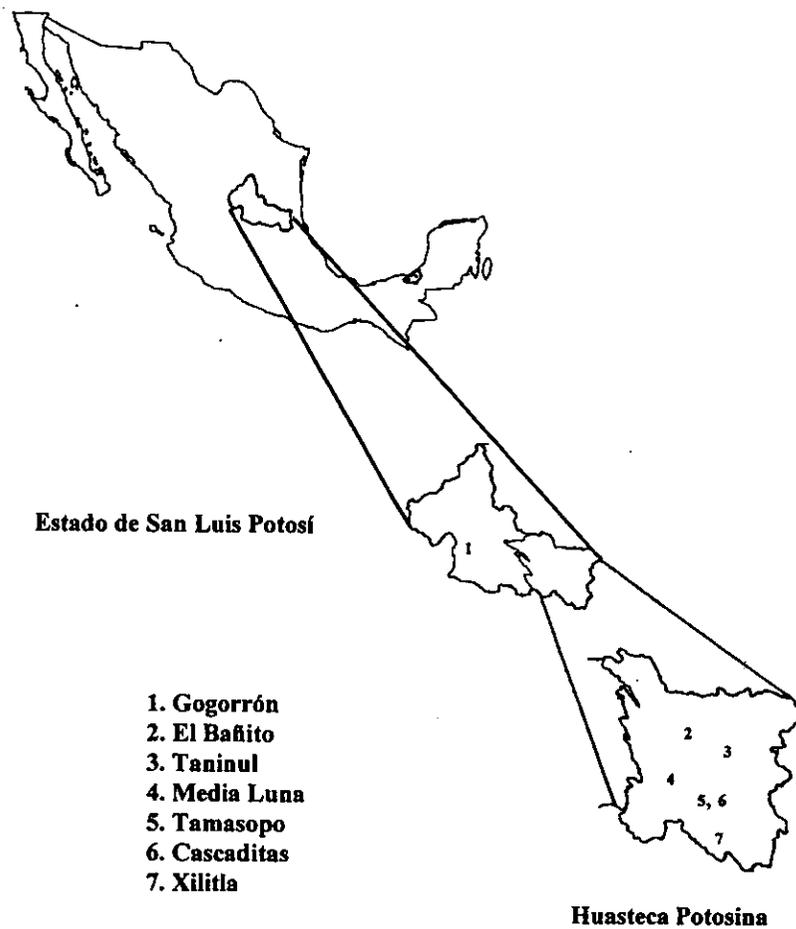


Figura 5. Localización de los sitios de muestreo.

III. OBJETIVOS

Aislar e identificar *Naegleria fowleri* de los diferentes cuerpos de agua del estado de San Luis Potosí.

Detectar *Naegleria fowleri* por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los balnearios más importantes del estado de San Luis Potosí.

Determinar en animales de laboratorio la patogenicidad de las amebas aisladas.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Para detectar la presencia de *Naegleria fowleri*, se seleccionaron siete de los balnearios de mayor importancia turística en el Estado de San Luis Potosí y que por estudios previos (Bonilla et al., 1999) existía el antecedente de la presencia del género *Naegleria*. En cada uno de los sitios (balnearios) se realizaron 3 muestreos: diciembre de 1995, en junio de 1996 y en enero de 1997. Se analizaron balnearios naturales y artificiales (incluyendo aquellos que tienen piscinas), tanto termales como no termales (Ver figura 6).

Para la presentación de los resultados, las muestras fueron etiquetadas con la siguiente nomenclatura:

- Número de muestreo: I (diciembre 1995); II (junio 1996); III (enero 1997)
- Abreviatura de la localidad de muestreo.
- Número consecutivo de la muestra tomada de cada localidad.

a) Recolecta y transporte de las muestras

Se recolectó agua en frascos esterilizados de 1 litro de capacidad por duplicado en cada sitio, la toma de muestra se realizó en los primeros 10 cm bajo la superficie del agua considerando cúmulos de algas y demás partículas flotantes, ya que en estas aumentan la probabilidad de aislar mayor número y diversidad de amebas, pues estos organismos de manera característica viven, se alimentan y desplazan sobre partículas sólidas flotantes (Kail, 1987). Además, las muestras fueran tomadas en las zonas más accesibles de los cuerpos de agua, considerando éstas, como las zonas donde las personas prefieren nadar o descansar.

El número total de muestras se dividió en dos grupos; al tomarse dos muestras por sitio muestreado. Con un grupo de muestras se trabajaron las pruebas convencionales de laboratorio para aislar AVL que pertenecieran al género *Naegleria*. Las que se transportaron las frascos a temperatura ambiente al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Luis Potosí, (Unidad Valles), donde se centrifugaron, en volúmenes pequeños (50ml) a 2500 rpm en una centrifuga SOL-BAT, Mol C-300, durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento se vertió sobre cajas de Petri que contenían medio NNE, (ver Apéndice 1). Así se mantuvieron hasta llevar todo el material al laboratorio del Proyecto CyMA.

El otro grupo se trabajó de manera directa en la detección de *Naegleria fowleri* con la técnica de PCR, así las botellas con el agua muestreada se mantuvieron en hielo, para evitar la lisis de las células, hasta la llegada al laboratorio del Proyecto CyMA en el campus Iztacala, donde se filtraron con membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro con el equipo Millipore. Lo que se retenía en la membrana se resuspendía en un tubo con amortiguador Tris-EDTA (TE) por agitación con un vórtex, después se procedía de manera directa a la purificación del ADN.

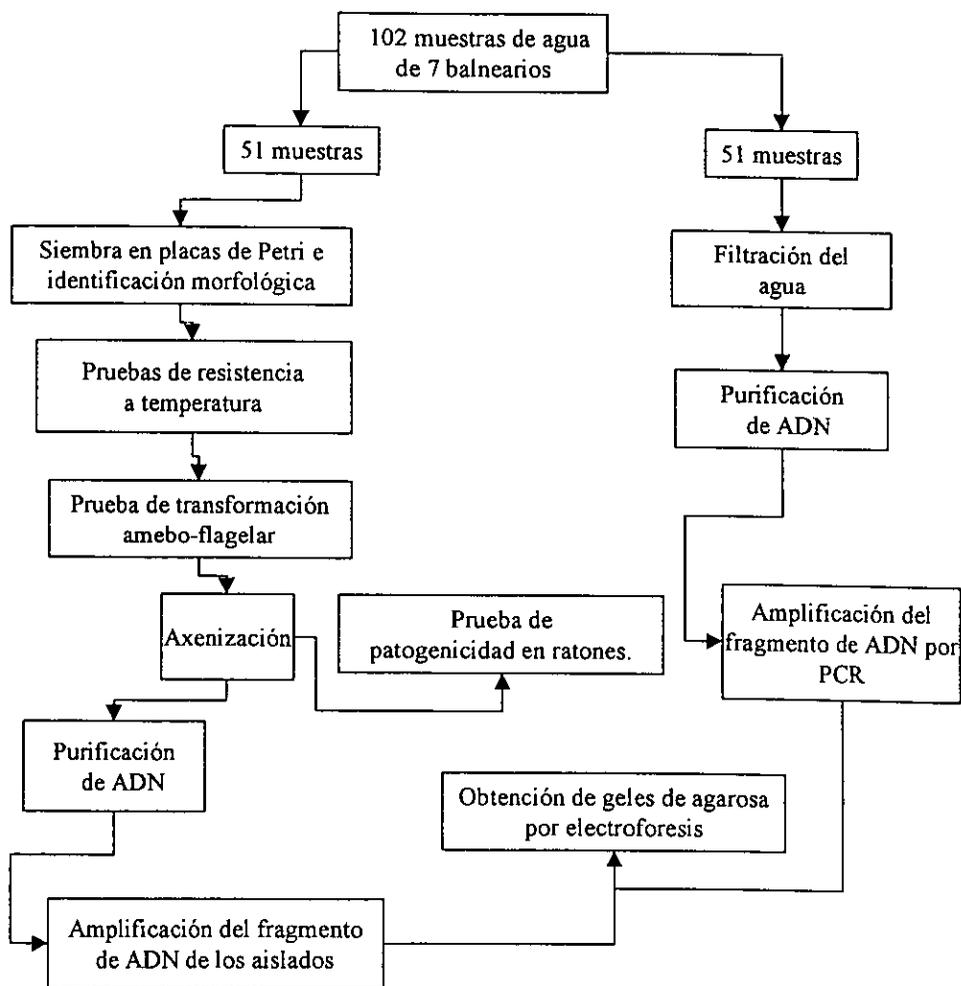


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología empleada para la detección de *Naegleria fowleri*

b) Aislamiento de las amebas de la especie *Naegleria fowleri*

El total de cajas de Petri obtenidas para el aislamiento de *Naegleria fowleri*, se mantuvieron en observación y cuando las muestras fueron positivas a la presencia de AVL, se aislaron estos organismos con la ayuda del microscopio para obtener pequeños fragmentos del agar para resembrarla a una nueva caja de Petri. Eliminando así a otros organismos contaminantes del medio de cultivo como bacterias y hongos, cuando los organismos contaminantes, principalmente las bacterias; no se eliminaban de esta forma se procedió a utilizar penicilina como antibiótico.

c) Prueba de tolerancia de temperatura

Las cajas de Petri primero se incubaron a tres diferentes temperaturas a 37, 42 y 45°C por 24 h donde se eliminó a todas las cajas donde no se desarrollaran amebas, solo se mantuvieron las amebas termófilas, donde se incluía al género *Naegleria*. Se mantuvieron por otras 48 h para corroborar su tolerancia a las temperaturas de 42 y 45° C, después se mantuvieron a 37°C. De estas cajas de Petri se hicieron pruebas para observar con ayuda de las clave de Page (1988) y el microscopio óptico; como en el de contraste de fase en aumentos 40X o de 10X para identificación morfológica.

d) Prueba de transformación ameboflagelar

Las AVL que toleraron temperaturas de 37, 42 y 45° C, se determinó si tenían capacidad de transformación de forma trófica a ameboflagelar, lo que consistió en colocar en una caja de Petri donde estaban creciendo las amebas, un ml de agua destilada, después se observó al microscopio a 10 X o 40 X en contraste de fases (Page, 1988) a intervalos de 30 min para determinar si aparecían formas flageladas. Cuando era positiva la prueba nos garantizaba que los organismos era de la familia Vahlkampfiidae y con muchas posibilidades de ser del género *Naegleria* (Rivera y López-Ochotorena, 1978).

e) Axenización

Todas las muestras que presentaron transformación flagelar, se traspasaron a un medio líquido donde la fuente de carbono fuese suero fetal de bovino, a este procedimiento se le conoce como axenización, con el fin de que los trofozoítos crecieran libres de bacteria pues serían usados en las pruebas de patogenicidad en ratones y en las pruebas de biología molecular. Los trofozoítos fueron transferidos al medio líquido cortando pequeños trozos del agar en donde se observó el mejor crecimiento amebiano, se introdujeron en el medio líquido y se incubaron a 45 °C, manteniendo los tubos inclinados y sin agitación con el fin de que las amebas pudieran adherirse en la mayor superficie posible del tubo (De Jonckheere, 1977). Para mantener a las amebas por períodos prolongados se realizaron resiembras en tubos con el medio con que se axenizó.

Los medios líquidos que se utilizaron para axenizar fueron el medio PBSGM o medio Chang, el medio de Bactocasitona y el medio PYNFH, (Apéndice 1). En ocasiones fue

necesario agregar vitaminas, y para evitar la contaminación bacteriana, se agregó penicilina sódica, estreptomycin y kanamicina en concentraciones de 200 µg/ml (De Jonckheere, 1977).

f) Prueba de patogenicidad en ratones

La patogenicidad de los trofozoítos aislados se determinó en ratones inmediatamente después de la axenización para evitar la disminución de la virulencia de las amebas (De Jonckheere *et al.*, 1983, 1984; Reilly *et al.*, 1983b; Wong *et al.*, 1975). La inoculación de los ratones fue realizada por inoculación intracerebral y por instilación nasal. Para inoculación intracerebral se hizo un concentrado por centrifugación de los trofozoítos del cultivo axénico, en su fase exponencial del crecimiento, hasta una densidad de 1×10^6 /ml. Las amebas fueron inyectadas en un volumen de 20 µl con una jeringa para insulina; la aplicación fue intracerebral a través de la articulación interparietal, a la altura de las orejas (Batista *et al.*, 1982; Ferrante, 1991; Pidherney *et al.*, 1993).

Para la inoculación por instilación nasal, se utilizó la misma dosis en una jeringa de insulina directamente a los orificios nasales del ratón. Ambas pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en grupos de cinco ratones blancos machos de la cepa CD-1, de tres semanas de edad para cada aislamiento amebiano a probar.

Los ratones inoculados se vigilaron diariamente para determinar la mortalidad de los mismos. Los ratones inoculados con amebas que sobrevivieron 21 días, fueron sacrificados y diseccionados para sembrar trozos de algunos órganos (cerebro, hígado, pulmones y riñones) en placas con medio NNE, que se mantuvieron a 45 °C por 24 h. A los ratones muertos antes de los 21 días también se les extrajeron los órganos y se sembraron de la misma manera.

Una cepa amebiana se le considera patógena cuando la mortalidad de ratones alcanza el 60% por cualquiera de las dos vías, aunque se reconoce con mayor validez a la prueba por instilación nasal, por ser la forma más común de invasión de parte de estos organismos.

g) Material biológico de referencia

Como referencia se utilizó la cepa llamada KUL, tipo American Type Culture Collection con la clave 30808. Esta cepa de *Naegleria fowleri* que fue aislada del cerebro de un paciente con MEAP en Bélgica (Kilvington, 1995b). Asimismo, se utilizaron las cepas identificadas con anterioridad en el Proyecto CyMA (Rivera *et al.*, 1983; 1984b; 1986; 1989; 1992 y 1993).

h) Purificación del ADN de las cepas de referencia y de las muestras

Los organismos axenizados se cultivaron en botellas de cultivo de 40 ml; cuando el cultivo estaba en su fase de mejor crecimiento (fase log), se les centrifugó a 2500 rpm, a la

pastilla, obtenida se le agregaron 4 ml de solución amortiguadora de lisis celular (cell lysis buffer), también se le agregaron 30 µl de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K (Sigma Chemical Co.) y 400 µl de Sarcosil al 20% (N-Lauroyl-Sarcosine, Sigma Chemical Co.), y se incubaron a 56 °C por toda la noche.

Después se transfirió todo el contenido de la lisis a tubos separadores de suero (SST blood collection tube; Becton Dickinson) en donde se añadieron 4 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamilo (25:24:1). Se mezclaron suavemente por espacio de 10 minutos, procediendo inmediatamente a centrifugar a 1200 x g por 10 min. La fase separada por el tubo se puso en otro tubo nuevo, repitiendo el proceso de tres a cuatro veces. La última extracción en estos tubos se realizó solo con cloroformo y alcohol isoamilo (24:1). Posteriormente la fase separada se transfirió a tubos de polipropileno donde se añadió un volumen equivalente de iso-propanol anhidro, que se conservaba a -20 °C al volumen recuperado de los tubos separadores de suero. Se mezcló suavemente y se les mantuvo toda la noche a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 2000 x g por 20 min y se retiró el sobrenadante con una micropipeta. Esta pastilla fue enjuagada dos veces con 2 ml de etanol al 70 % y una vez con etanol absoluto, entre cada enjuagada se centrifugaba brevemente y se removía el sobrenadante con una micropipeta, después se dejó secar la pastilla en un desecador al vacío y por último se disolvió en 50 µl de solución amortiguadora TE hasta su posterior utilización. Para eliminar ciertas sales y otros artefactos se utilizó un paquete de purificación de ADN (Prep-A-Gene DNA purification Systems).

i) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR Sytem 2400) y con el paquete de reactivos (GeneAmp PCR Reagent Kit) y la enzima polimerasa (Ampli Taq DNA polymerase).

A cada microtubo se le agregaron 53.5 µl de agua destilada, 10 µl de buffer PCR, para 16 µl de la suma de las cuatro desoxiribonucleótidos (dntp), 0.5 µl de Amp Taq 5 µl de cada uno de los iniciadores (primers) y 10 µl de ADN de la muestra o de la cepa de referencia. Así el volumen total de la reacción fue de 100 µl.

Los parámetros que se utilizaron para realizar las amplificaciones por PCR fueron los utilizados por el Dr. Kilvington y John Beeching (1995), donde aproximadamente 100 ng de muestra de ADN se les realizó el siguiente protocolo:

- Colocar el tubo en un controlador de los ciclos térmicos
- Desnaturalizar el ADN por calentamiento a 96 °C por 5 min.
- El inicio del ciclo es un calentamiento a 95 °C por 1 min. para desnaturalizar el ADN
- Los iniciadores se alineaban a 55 °C por 1 min.
- Los iniciadores tienen Tm teóricos de 56 °C (Calculados por $T_m = 2 °C (A + T) + 4 °C (G + C)$)

- Extensión de los iniciadores a 72 °C por 1 min.
- El número de ciclos fue de 35
- Al terminar el último ciclo se mantenía la temperatura de 72 °C por 7 min.
- Se enfriaba a 5 °C para retirar el tubo del controlador de ciclos térmicos

Los iniciadores utilizados se tomaron directamente de Kilvington y Beeching, (1995b) quienes los secuenciaron a partir de ADN cromosomal de *Naegleria fowleri* llamándolo pB2.3, los autores demuestran la especificidad de estos iniciadores al probarlos en diferentes amebas de vida libre como otras especie y solo se amplificó el ADN de las cepas de *Naegleria fowleri* incluyendo la cepa KUL. La construcción de los iniciador:

adelante (forward): GCTATCGAATGGATTCAAGC,
reversa (reverse): CACTACTCGTGGGAAGGCTTA.

j) Electroforesis en geles de agarosa.

Se disolvió por ebullición la agarosa al 1 % en amortiguador TBE a concentración de 0.5X, después de enfriar se le agregó 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Se vertió en el molde del gel con los extremos sellados con cinta para autoclave y el peine formador de pozos adecuado, para tener geles de 0.5 cm de grueso, se dejó madurar por 30 min. Se retiran del gel el peine y las cintas, dejando solo el gel en el molde, de esta manera se puso el gel en el aparato de electroforesis, se vació amortiguador TBE 0.5X dentro del aparato de electroforesis hasta que el gel se sumergiera unos 3 mm bajo el amortiguador. Después en los pozos de cada extremo se puso 2 ml de marcador molecular con 2 µl de amortiguador "gel loading", en lo referente a las muestras se tomó 17 µl de ADN de la muestra o aislado, en el caso de la cepa de referencia solo se tomó 10 µl, a cada microtubo se le añadió también 2 µl de "gel loading" se centrifugó brevemente y se pasaron en el pozo que les correspondía. Se conectó el aparato a la fuente de poder durante el tiempo requerido que fue de una hora a una hora y media aproximadamente con un voltaje de 60 voltios, dando un corrimiento aproximado de 4 voltios/cm². Terminado la electroforesis se procedió a observar el gel bajo luz ultravioleta a 305 nm. Para tomar la fotografía, se utilizó película instantánea Polaroid 665 en un sistema de cámara Polaroid MP-4, con filtros naranja Wratten 23 A entre el gel y la cámara y un filtro Wratten 2A UV entre la fuente de luz y el filtro 23A. El tiempo de exposición fue 30 segundos con una apertura del lente de f 4.5. La película se reveló de acuerdo al fabricante.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Recolección de las muestras

Las muestras totales fueron 102, se dividieron en dos grupos (se tomaron dos muestras para cada sitio). Con un grupo (51 muestras) se trabajó de manera tradicional, esto es principalmente el obtener a los organismos axenizados para proceder a su identificación. El otro grupo se procedió a detectar la presencia de *Naegleria fowleri* por medio la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) después de realizar una purificación de ADN a los organismos filtrados del agua muestreada. A los organismos aislados también se les realizó al final la prueba de PCR.

b) Aislamiento de amebas por pruebas tradicionales

Del primer muestreo 12 muestras fueron positivas para AVL, termotolerantes a 42 y 45 °C y transformación ameboflagelar. Estos organismos se concentraron en El Bañito, Taninul y Gogorrón, tres de los siete cuerpos de agua muestreados en este trabajo. Esto concuerda con los resultados de los estudios anteriores que se han presentado por este mismo proyecto (Bonilla *et al.*, 1999).

En el Estado de San Luis Potosí la mayoría de los acuíferos con aguas termales son aprovechados con fines turísticos por lo que aquellos que presentan condiciones ideales de terreno y suministro abundante de agua han sido entubados y el agua ha sido confinada en piscinas, tal es el caso del El Bañito, Taninul y Gogorrón.

Los balnearios referidos son considerados como los más importantes de la región ya que ofrecen servicio de aguas termales al público. En general se acepta que los cuerpos de agua con elevada temperatura ofrecen un lugar libre de competencia y con escasa o nula depredación para AVL (Marciano-Cabral, 1986). En la tabla 7 se muestran los valores de temperatura en el agua y en el ambiente en los diferentes sitios que resultaron positivos para AVL con la presencia del género *Naegleria*. El Bañito fue el que presentó el mayor número de aislados; 7, Taninul 4 y Gogorrón 1. En la misma tabla se destaca que durante los distintos muestreos estos sistemas mantienen temperaturas casi constantes con una variación de solo 3 °C durante los distintos muestreos, también se observó que las piscinas de agua termal sus temperatura está entre los 31 y los 40.7 °C.

Tabla 6. Balnearios visitados y muestras recogidas para cada uno de los dos grupos de trabajo.

Balnearios	Muestreo diciembre 1995	Muestreo junio 1996	Muestreo Enero 1997	Total de muestras
Gogorrón: (G)	IG1	IIG4	IIIG7	9
	IG2	IIG5	IIIG8	
	IG3	IIG6	IIIG9	
Taninul (Tn)	ITn1	IITn4	IIITn8	11
	ITn2	IITn5	IIITn9	
	ITn3	IITn6	IIITn10	
		IITn7	IIITn11	
Bañito (B)	IB1	IIB5	IIIB9	12
	IB2	IIB6	IIIB10	
	IB3	IIB7	IIIB11	
	IB4	IIB8	IIIB12	
Media	IM1	IIM4	IIIM7	9
Luna (M)	IM2	IIM5	IIIM8	
IM3	IIM6	IIIM9		
Tamasopo (Tm)	ITm1	IITm2	IIITm4	5
		IITm3	IIITm5	
Xilitla (X)	IX1	IIX2	IIIX3	3
Cascaditas (Ca)	----	IICa1	IIICa2	2

El Bañito

El balneario El Bañito, tiene dos albercas profundas para adultos y un chapoteadero para niños, la alberca referida como 2 es la más visitada por el público, por su cercanía al chapoteadero, por esta razón se recolectó mayor número de muestras. Fue en ésta en donde se obtuvieron el mayor número de aislado; los aislados totales fueron 12 de los cuales 7 resultaron para este balneario y 4 se encontraron en la alberca 2. El balneario del Bañito tuvo el 58.3 % de los aislados totales.

Taninul

El balneario de Taninul, presenta características únicas ya que el manantial que alimenta a la única alberca de este centro recreativo es de agua sulfurosa alcalina con una temperatura promedio de 42 °C, haciendo que las aguas de este lugar sean consideradas como terapéuticas para curar algunas enfermedades como: reumatismo, neuralgia así como padecimientos de la piel. Por esta razón es un lugar concurrido en temporada vacacional además de las organizaciones de medicina naturista que de manera más recurrente realizan eventos en este lugar.

El cuerpo de agua presenta una gran cantidad de algas así como bacterias del azufre en cúmulos de materia orgánica e inorgánica (tierra), que está flotando en la alberca y que las personas que concurren a nadar los utilizan al untárselo en el rostro, buscando beneficio cosmético, por esta situación -gran cantidad de materia orgánica- el lugar es muy propicio para el desarrollo de AVL, aquí se obtuvo el 33.3 % de los aislados de AVL.

Gogorrón

El balneario Gogorrón es un complejo para la diversión acuática constituido de tres albercas y de tinas romanas, estas últimas están cubiertas y son las primeras que se alimentan del manantial de aguas termales por lo que el promedio de temperatura del agua es de 42 °C. De allí, el agua es distribuida a las demás albercas a cielo abierto bajando considerablemente su temperatura hasta alcanzar un valor promedio de 30 °C. La situación de este balneario en comparación con los anteriores es diferente ya que es un sitio donde se procura el buen mantenimiento (limpieza y desinfección) de las instalaciones. Las albercas aquí son cloradas y lavadas una vez a la semana. En este balneario se obtuvo un aislado significando el 8.3% del total de los aislados. Cabe mencionar aquí, que éste se encontró en la alberca 2 que era al momento de visitarla la más concurrida en el segundo muestreo.

En los balnearios restantes: Media Luna, Tamasopo, Xilitla y Cascaditas, no se detectaron organismos de AVL termotolerantes. La posible explicación a este hecho es que son cuerpos de agua naturales, el agua fluye de manera natural y no esta entubada o contenida en una piscina y por lo tanto aunque, los lugares son muy concurridos y los ríos que los abastecen por lo general son utilizados para las personas de las localidades para bañarse o lavar ropa, utensilios de cocina, etc., no hay suficiente acumulo de materia orgánica para mantener los requerimientos de alimento de las AVL's. En estos lugares no se encontraron amebas que toleraran temperaturas de más de 37 °C. Estos cuatro centros recreacionales no tienen aporte de agua termal lo que disminuyó sensiblemente la posibilidad de poder encontrar amebas termotolerantes como ya se mencionó anteriormente.

Tabla 7. Relación de la temperatura presentada en el agua/ambiente.

Clave de la muestra	Muestreo I		Muestreo II		Muestreo III		Organismos aislados
	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	
Gogorrón							
Alberca I	IG1	26.4	23.8	29.4	29.7	28.5	26.0
	IIG4						
	IIIG7						
Alberca II	IG2	26.8	23.7	29.6	30.2	28.5	26.0
	IIG5*						
	IIIG8						
Tina romana	IG3	42.7	37.5	42.5	37.2	41.3	37.0
	IIG6						
	IIIG9						
Tanínul							
Alberca principal (borde)	ITn1	36.6	23.0	39.2	32.8	37.5	25.4
	IITn4*						
	IIITn8*						
Alberca principal centro	ITn2*	37.6	23.4	41.9	32.9	38.7	25.9
	IITn5*						
	IIITn9						
Salida alberca principal	ITn3	35.5	23.4	39.2	31.3	29.3	26.7
	IITn6						
	IIITn10						
Canal de salida	IITn7	31.5	31.2	31.5	31.2	28.5	26.0
	IIITn11						
El Bañito							
Alberca I	IB1*	32.0	26.8	32.5	31.0	31.0	19.4
	IIB5*						
	IIIB9						
Alberca II	IB2	31.0	26.4	33.7	30.7	31.4	19.1
	IIB6*						
	IIIB10*						
Alberca II	IB3	31.6	26.0	33.4	30.3	30.2	20.2
	IIB7*						
	IIIB11*						
Chapoteadero	IB4	29.1	26.6	30.6	30.5	28.0	19.7
	IIB8*						
	IIIB12						

* Aislamiento de AVL, con transformación ameboflagelar y termotolerante a 42 y 45 °C.

Un factor que debe considerarse cuando se buscan AVL en ambientes naturales, además de la temperatura del agua es la temperatura ambiental. La importancia de la temperatura en el ambiente, se hace más importante como ya se explicó antes, porque las amebas patógenas tienden a crear un sistema de competencia con mayor capacidad para desplazar a otras amebas que no son patógenas cuando el ambiente es más cálido en una relación

directamente proporcional, considerando que la temperatura del ambiente tiene incidencia sobre la temperatura que puedan tener los cuerpos de agua. Además es notorio que aumenta el número de usuarios de estos sistemas recreacionales, debido al incremento de la temperatura que se alcanza durante el día, sobre todo en la temporada de verano en la Huasteca Potosina, y los bañistas buscan albercas para refrescarse, aunque estas sean termales.

Existen reportes en donde se menciona que en la época más calurosa del año hay un aumento en los casos de MEAP debidas a AVL (John, 1993; Lares-Villa *et al.*, 1993), también se señala la relación directa que existe entre la presencia de AVL con potencial patógeno y la temperatura elevada del agua (Kilvington *et al.*, 1991b; Martínez y Visvesvara, 1997).

A pesar de que no es posible emitir una explicación simple para la presencia de AVL, es claro que los anteriores balnearios/piscinas representan un riesgo considerable para los bañistas que los frecuentan.

La distribución de *Naegleria* spp que encontramos en los tres diferentes balnearios podría deberse a cuatro posibles causas:

- a) El agua contenida en los sistemas recreacionales artificiales, aunque es agua corriente (de manantial), permanece confinada durante más tiempo, lo que permite una mayor acumulación de materia orgánica y bacterias que favorecen la proliferación de las amebas, a diferencia de los cuerpos de agua naturales donde el agua fluye constantemente a una velocidad mayor y la dilución tanto de materia orgánica como de los propios organismos es alta.
- b) La gran afluencia de bañistas a El Bañito, Taninul y Gogorrón pueden ser un factor importante de aporte de amebas al agua, debido a que estas albercas están rodeadas de pasto y tierra y el caminar de los visitantes puede aumentar en las albercas el número de AVL, bacterias y otros nutrimentos que favorezcan la sobrevivencia de estas amebas. Ha sido demostrado ampliamente que el suelo es una de las principales fuentes de AVL.
- c) El agua caliente. Algunos grupos de amebas se desarrollan mejor a temperaturas mayores de 25 °C en el agua, pero cuando ésta aumenta, algunos organismos termotolerantes son más resistentes que otros, desplazándolos y ocupando mayor cantidad de espacio (como es el caso de las AVL). Considérese que la temperatura promedio de los tres sistemas recreacionales antes citados es de 35.6 °C.
- d) Mantenimiento de los sistemas recreacionales. La limpieza y la desinfección de las piscinas es un factor que influye directamente en la presencia de las amebas en el lugar. Como se hace notar en el caso de Gogorrón (Tabla 2) aunque la temperatura es elevada (hasta 40.7 °C), solo se encontró un aislado al tener un mejor control de mantenimiento en la limpieza de las piscinas.

c) Pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio

Los resultados de la prueba de patogenicidad se muestran en la tabla 8. Se observa que los aislados marcados como IB1 del balneario El Bañito, fueron los únicos que presentaron tanto en la inoculación nasal (IN) como en la inoculación intracerebral (IC) el 100 % de patogenicidad. Ahí se destaca que siete de los organismos del grupo de AVL no eran patógenos por vía nasal, mientras que en los cuatro restantes por inoculación intracerebral la patogenicidad fue alta en el caso del grupo de aislados; IIB5, IIB6 y IIB7 del Bañito. Por morfología y pruebas de patogenicidad se consideran los aislados *Naegleria lovaniensis* para las no patógenas y *Naegleria australiensis* que se ha demostrado su patogenicidad en ratones pero no en humanos y para el caso de la IB1 se llegó a la identificación de *Naegleria fowleri*.

Tabla 8. Aislados de amebas patógenas en ensayos con ratones de laboratorio

Clave del aislado	Mortalidad (%)		Trofozoítos recuperados de órganos
	IN (N=5)	IC (N=5)	
IIG5	0	40	P
ITn2	40	60	---
IITn4	0	0	---
IITn5	40	60	P y C
IIITn8	0	0	---
IB 1	100	100	P y C
IIB5	0	60	C
IIB6	0	60	P y C
IIB7	0	60	---
IIB8	0	0	---
IIIB 10	0	0	---
IIIB 11	0	0	---

Sólo se incluyeron los aislados que ocasionaron una mortandad igual o mayor al 60% (Wong *et al.*, 1975).

Abreviaturas: IN, instilación nasal; IC, inoculación intracerebral, C, cerebro; P, pulmón.

N=5, lote de 5 ratones inoculados. Se corrieron lotes control de ratones inoculados por las dos vías con agua estéril. (-) No hubo recuperación.

Los órganos (cerebro, pulmón e hígado) de los ratones que murieron o que fueron sacrificados pasados 21 días después de la inoculación, se extrajeron quirúrgicamente y segmentos de aproximadamente 1 cm³ fueron sembrados en placas de NNE para recuperar los trofozoítos amebianos y confirmar la capacidad de invasión de los órganos considerados blanco.

Por inoculación intracerebral y por instilación nasal se introducen los trofozoítos directamente en cerebro y pulmón que son los órganos que mantienen altas concentraciones de oxígeno. En general, la inoculación intracerebral causó la muerte de los ratones más rápidamente (en seis días como máximo), mientras que por instilación

nasal la muerte no ocurrió sino hasta que los ratones fueron sacrificados a los 21 días. El tipo de inoculación intranasal, es el mecanismo más parecido a la manera en que estos organismos infectan a las personas.

El balneario El Bañito, sobresalió en el aislamiento de amebas género *Naegleria* lo que demuestra que es un hábitat que favorece las condiciones para su sobrevivencia y desarrollo.

d) Resultados de las amplificaciones de los aislados por PCR

De los 12 aislados amebianos aislados de cuerpos de agua en el estado de San Luis Potosí que identificados por morfometría correspondieron a la especie *Naegleria fowleri*, solo el aislado IB1 resulto positivo para amplificar un segmento específico de ADN para *N. fowleri* al ser analizados por PCR. Esto significa que los otros 11 organismos identificados como *N. fowleri* tienen una apariencia muy semejante a esta ameba y pueden ser confundidos con facilidad, sin embargo, al ser analizados a nivel bioquímico se pueden detectar sus diferencias con relativa facilidad. Para comprobar este resultado, una muestra de ADN obtenida de la cepa de referencia de *Naegleria fowleri* (KUL 30808) del ATCC se amplificó por PCR para buscar la presencia de las bandas específicas conocidas en la cepa. En la figura 7 se muestra la banda amplificada de la cepa de referencia y se observa también como el aislado IB1 tiene el mismo segmento al mismo nivel de peso molecular, dado que los primers utilizados son específicos para la amplificación de este segmento se considera que ambas amebas corresponden al mismo género *Naegleria fowleri*.

Se recomienda que en el análisis de PCR la cantidad mínima de muestra de ADN obtenida para amplificar un segmento sea entre 0.05 y 1.0 µg. En la purificación de ADN de los aislados la cantidad mínima requerida fue alcanzada. También fue importante el haber obtenido alta calidad de purificación del ADN ya que después de la obtención con fenol/cloroformo/alcohol isoamilo, se le eliminaron todo tipo de residuos por medio de un paquete comercial para purificación de ADN y la marca de las bandas obtenidas por amplificación fue clara y no se observaron otras bandas denominadas "artefactos" que pudieran confundir el resultado.

Al resultar positiva la prueba de PCR para el aislado IB1 y compararla con la prueba de 100% de patogenicidad para los aislados en los dos tipos de inoculación se tuvo la certeza de que el aislado analizado pertenece a la especie *Naegleria fowleri*. Por otra parte, del análisis morfométrico de las otras once muestras se concluyó que ellas pertenecen al género *Naegleria*, y específicamente al género *N. australiensis* por el hecho de haber sido patógenas para ratones (Page, 1988). En este punto se puede mencionar que al comparar la técnica de PCR con la técnica de aislamiento e identificación de amebas en placas de NNE, se puede ver una desventaja en la técnica de placas de NNE para aislar a las amebas ya que cuando se está haciendo la selección de los organismos termotolerantes por diferentes temperaturas y se hace la resiembra a otra placa, se pueden eliminar otros organismos de interés al confundirlos con algunos de su mismo género y que también pueden tolerar temperaturas mayores de 37°C (Červa, 1996).

e) Identificación directa de *N. fowleri* por PCR en las muestras de agua

De los siete balnearios donde se obtuvieron las 51 muestras de agua (Tabla 6) para buscar *N. fowleri* utilizando de manera directa el análisis por PCR se obtuvieron 8 amplificadas positivas; todos pertenecientes a muestras obtenidas del balneario El Bañito (Figura 8). Seis de las muestras son de la piscina 2 que es la más concurrida y caliente, mientras que las dos restantes fueron obtenidas del chapoteadero, es importante destacar que la alberca más visitada sea también la que presenta el mayor número de aislados (más del 65%), además de que la detección de *N. fowleri* haya sido recurrente para los tres muestreos, este hecho deja ver la importancia de esta clase de estudios para poder tomar medidas pertinentes a evitar el posible contagio de esta ameba por los bañistas de manera que las personas que habitualmente frecuentan estos espacios recreativos estén informados para que puedan tomar las medidas adecuadas de higiene y la precaución para enfrentar este tipo de situación en la que una persona sana puede infectarse gravemente por nadar en un lugar contaminado con AVL potencialmente patógenas.

En las figuras 9 y 10 se muestran las amplificaciones que resultaron negativas para las 20 muestras tomadas de los balnearios de Gogorrón y Taninul. En estas figuras solo se puede apreciar el marcador de peso molecular y la amplificación positiva para la prueba de PCR de la cepa KUL.

Utilizando la prueba de PCR como método alternativo para detectar específicamente la presencia de *Naegleria fowleri* a partir de muestras de agua termal de la Laguna de la Media Luna, se puede ver en la figura 11 que a partir de ADN total extraído de nueve muestras en ninguna se pudo amplificar el segmento específico determinado por el iniciador de *N. fowleri*, sin embargo, sí se amplificó el ADN de KUL utilizado como testigo positivo, con lo que se concluye que la Laguna de la Media Luna es un hábitat de agua termal donde no hay presencia de *N. fowleri*.

Finalmente, el ADN total obtenido de 10 muestras de agua no termales de los balnearios Xilitla, Las Cascaditas y Tamasopo fueron negativos a la amplificación por PCR para detectar la presencia de *N. fowleri*. En la Figura 12 se aprecia que no hay bandas aparentes además del testigo positivo KUL que muestren que haya habido amplificación a partir del iniciador positivo. La ausencia de bandas nos indica que en ninguno de los casos hubo presencia de *N. fowleri* en estos balnearios, lo cual es apoyado por el análisis convencional por placas de NNE en donde tampoco se aislaron organismos amebianos del género *Naegleria*.

Es interesante el hecho que por medio de este tipo de técnicas como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podamos de una manera rápida y con una confiabilidad alta, conocer la presencia o ausencia de organismos patógenos como es el caso de este tipo de amebas.



Figura 7. Gel que muestra la amplificación del único aislado que presentó 100 % de patogenicidad (IB1). El espacio vacío corresponde a los once aislados que resultaron negativos a la amplificación; se observa también en los márgenes al marcador de peso molecular y a la izquierda la amplificación de la cepa de referencia (KUL). 1. IIG5, 2. IITn8, 3. IITn5, 4. IITn4, 5. ITn2, 6. IIB11, 7. IIB10, 8. IIB8, 9. IIB7, 10. IIB6, 11. IIB5, 12. IB1.

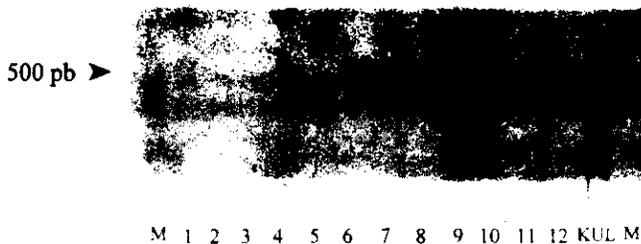


Figura 8. Gel que presenta las amplificaciones del fragmento de ADN por PCR en las muestras tomadas del balneario El Bañito, resultando ocho positivas y en donde sobresale que las muestras para la alberca II representan más del 65 %. 1. IB1, 2. IIB5, 3. IIB9, 4. IB4, 5. IIB8, 6. IIB12, 7. IB2, 8. IIB6, 9. IIB10, 10. IB3, 11. IIB7, 12. IIB11.



Figura 9. Resultados negativos a la amplificación de ADN para *Naegleria fowleri* en las nueve muestras tomadas de los diferentes sitios del balneario de Gogorrón, la amplificación que se observa es la de cepa KUL, es decir, la cepa de referencia. 1. IG1, 2. IIG4, 3. IIIG7, 4. IG2, 5. IIG5, 6. IIIG8, 7. IG3, 8. IIG6, 9. IIIG9.

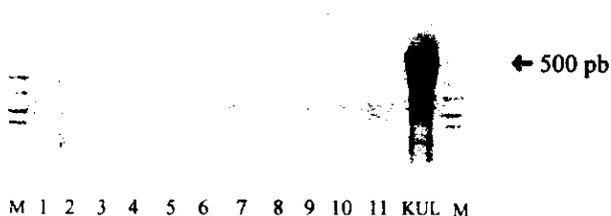


Figura 10. Resultados negativos del balneario Taninul, donde no se amplificó ninguna de las once muestras ahí tomadas, solo se observa la cepa de referencia. 1. ITn1, 2. IITn4, 3. IIITn8, 4. ITn2, 5. IITn5, 6. IIITn9, 7. ITn3, 8. IITn6, 9. IIITn10, 10. IITn7, 11. IIITn11.



Figura 11. Gel que muestra solo como positivo a la cepa de referencia y ninguna de las nueve muestras tomadas en el cuerpo de agua de la laguna de la Media Luna. 1. IM1, 2. IIM4, 3. IIM7, 4. IM2, 5. IIM5, 6. IIM8, 7. IM3, 8. IIM6, 9. IIM9.



Figura 12. En este gel se muestran los resultados de los tres balnearios Xilitla con tres muestras, Las Cascaditas con dos muestras y cinco muestras del balneario Tamasopo; como se puede apreciar no resultó ninguno positivo a la amplificación para *Naegleria fowleri*, excepto la cepa de referencia. 1. IX1, 2. IIX2, 3. IIX3, 4. IICa1, 5. IICa2, 6. ITm1, 7. IITm2, 8. IIITm4, 9. IITm3, 10. IIITm5.

En anteriores estudios (Bonilla *et al.*, 1999) ya se reportado la presencia de *Naegleria fowleri* en el balneario del Bañito aunque también en Taninul y Gogorrón, solo que ha sido primero aislando a los organismos como se manejó la mitad de las muestras tomadas en el presente trabajo y después se realiza las pruebas generalmente la técnica de isoelectroenfoque. Siendo esta la primera vez que las muestras tomadas sean solamente filtradas y después se hace la purificación del ADN total presente en la muestra para que se le realizara la prueba de PCR para poder determinar su presencia de *Naegleria fowleri*.

VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron 12 amebas de vida libre del género *Naegleria* spp. a partir de muestras de agua tomadas de balnearios de importancia turística en el Estado de San Luis Potosí.
2. De los aislados del género *Naegleria* spp. se aisló una ameba identificada como *Naegleria fowleri*, esta ameba en pruebas de patogenicidad mató al 100 % de un lote de cinco ratones y fue aislada de cerebro y pulmón.
3. El ADN del aislado *Naegleria fowleri* fue amplificado por PCR y comparado con el ADN de una cepa original de *N. fowleri* y se obtuvo un amplicón de tamaño referido para la cepa original en ambos casos, lo que demuestra que el segmento amplificado fue específico.
4. De las muestras de agua procesadas para obtener ADN total y que fueron amplificadas con iniciadores específicos para detectar encontramos ocho muestra positivas a la amplificación, pertenecientes exclusivamente al balneario El Bañito.
5. Es evidente que al utilizar la técnica de PCR en la identificación de *Naegleria fowleri* se reduce el tiempo de trabajo y se aumenta la eficiencia de los resultados. Se ahorra tiempo porque no se necesitan aislar a los organismos y posteriormente identificarlos, sino solo conocer su presencia o ausencia de las muestras, tiempo que sería de mucha utilidad en el tratamiento de un paciente, aunque su desventaja serían los costos del equipo y sus reactivos.
6. El balneario El Bañito, por los resultados del trabajo y sus características, muestra ser un hábitat idóneo para este grupo de organismos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, K. y Jamieson, A. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* i: 902-903.
- Apley, J., Clarke, S., Roome, A., Sandry, S., Saygi G., Silk, B. y Warhurst D. 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.* i: 596-599.
- Arnheim, N. y Erlich, E. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131-156.
- Barnett, N., Kaplan, A., Hopkin, R., Saubolle, M. y Rudinsky, M. 1996. Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*: clinical review. *Pediatr. Neurol.* 15: 230-234.
- Batista, N., Mascaró, C., Guevara, D. y Osuna, A., 1982. Capacidad patógena para el ratón albino de algunas especies de *Acanthamoeba* y *Hartmannella*. *Rev. Ibér. Parasitol.* 42: 95-102.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz R., Calderón, A., Gallegos, E. y Hernández, D., 1999. Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, México. En: *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Ed. por Manuwar, S. y Lawrence, I.. The Netherlands. (En revision).
- Butt, C. 1968. The pathology of amebic encephalitis. *J. Bull. Pathol.* 9: 83-92.
- Carter, R. 1970. Description of a *Neagleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimetal changes induced by it. *J. Pathol.* 100: 217-244.
- Centeno, M., Rivera, F., Červa, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E. y Suarez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res.* 27: 579-586.
- Červa, L., Serbus, C. y Skocil, V. 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol. Prague.* 20: 97-103.
- Clark, L., Cross, G., De Jonckheere, J. 1989. Evaluation of evolutionary divergency in the genus *Naegleria* by analysis of ribosomal DNA plasmid restriction patterns. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 281-296.

- Cordovilla, P., Valdivia, E., Gonzales-Segura, A., Galvez, A., Martinez-Bueno, M. y Maqueda, M. 1993. Antagonistic action of the bacterium *Bacillus licheniformis* M4 toward the amoeba *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40: 323-328.
- Cursons, R. y Brown, T. 1978. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity. *Science.* 127:1506.
- Chang, S. 1979. Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia Parasitol. Prague.* 26: 195-200.
- Das, S., Saha, A., Nerad, T., Martinez, A., Lamarco, K., Basu, A., Legler, G. y Gleu, R.. 1987. Partial purification and characterization of *Naegleria fowleri* β -glucosidase. *J. Protozool.* 34: 68-74.
- De Jonckheere, J. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 751-757.
- De Jonckheere, J. 1978. Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica.* 14: 457-481.
- De Jonckheere, J. 1979. Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur.* 77: 385-392.
- De Jonckheere, J. 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* 133 A: 319-342.
- De Jonckheere, J. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis.* UNAM, México. 70 pp.
- De Jonckheere, J. 1988. Geographic origin and spread of pathogenic *Naegleria fowleri* deduced from restriction enzyme patterns of repeated DNA. *Biosystems.* 21: 269-275.
- De Jonckheere, J., Aerts, M. y Martinez, J. 1983. *Naegleria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 712-716.
- De Jonckheere, J., Yagita K. y Endo T. 1992. Restriction-fragment-length polymorphism and variation in electrophoretic karyotype in *Naegleria fowleri* from Japan. *Parasitol. Res.* 78: 475-478.
- Dirección Estatal de Turismo del Estado de San Luis Potosí. 1993. *Guía Personal del Estado de San Luis Potosí.* Unicornio, México. 66 pp.

- Duma, R., Rosenblum, W., McGehee, R., Jhons, M. y Nelson, E. 1971. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericine B, and a review. *Ann. Intern. Med.* 74: 923-931.
- Eisen, D. y Franson, R. 1987. Acid-active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and sonicates of rabbit alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Acta.* 924:369-372.
- Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists*. Springer Verlag, Wisconsin. 197 pp.
- Ferrante, A. 1982. Comparative sensitivity of *Naegleria fowleri* to amphotericine B and amphotericine B methyl ester. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 476-478.
- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite. Immunol.* 13: 31-47.
- Ferrante, A. y Bates, E. 1988. Elastate in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect. Immun.* 56: 3320-3321.
- Fowler, M. y Carter, F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba*. *Appl. Brit. Med. J.* 2: 740-742.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Gonzales-Segura, A., Lebbadi, M., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M. 1993. Purification, characterization and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A1Z. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1480-1486.
- García, E. 1988. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. Larios, México. 217 pp.
- Goodfellow, M. y Board, R. 1980. *Microbiological Classification and Identification*. Academic Press. Nueva York. 23-42
- Gorospe, S., Band, R., Kopachik, W. 1996. Molecular cloning of and phylogenetic analysis of an actina in *Naegleria fowleri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 233-237.
- Griesemer, D., Barton, L., Reese, C., Jhonson, P., Gabrielsen, J., Talwar, D. y Visvesvara, G. 1994. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Pediatr. Neurol.* 10: 229-254.
- Hu, W., Kopachik, W. y Bond, R. 1992. Cloning and characterization of transcripts showing virulence-related gene expression in *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.* 60: 2418-2424.

- Hysmith, R. y Franson, R. 1982a. Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta.* 711: 26-32.
- Hysmith, R. y Franson, R. 1982b. Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta.* 712: 698-701.
- Jager, B. y Stamm, W. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet.* ii: 1343-1345.
- John, D. 1982. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 101-123.
- John, D. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. En: *Parasitic Protozoa*, Ed. por Kreier J. y Baker J. Academic Press, Nueva York. 140-246.
- John, D., Cole T. y Bruner R. 1985. Amebostomes of *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 32: 12-19.
- John, D., Howard, M. 1996. Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic free-living amoeba. *Folia Parasitol. Prague.* 43: 267-267.
- Kilvington, S. y Beeching, J. 1995a. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3764-3767.
- Kilvington, S. y Beeching, J. 1995b. Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2071-2078.
- Kilvington, S., Beeching, J. y White, G. 1991a. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29: 310-314.
- Kilvington, S., Mann, P. y Warhurst, D. 1991b. Pathogenic *Naegleria* amoebae in the waters of Bath, a fatality and its consequences. En: *Hot Springs of Bath*, Ed. por Kellaway, G. Bath City Council, Reino Unido. 89-96.
- Kyle, D. y Noblet, G. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaquena. *J. Protozool.* 34: 10-15.
- Lalitha, M., Anandi, V., Srivastava, A., Thomas, K., Cherian, A. y Chandi, S. 1985. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 21: 666-667.

- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J., De Maura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C. y Visvesvara, G., 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 685-688.
- Lee, J., Hutner, S. y Bovee, E. 1985. *An Illustrated Guia to the Protozon.* Soc. Prot. Allen Press, Inc., Kansas. 622 pp.
- López-Corella, E., De León, B. y De Jonckheere, J. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo Michoacán México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **46**: 619-622.
- Lowrey, D. y McLaughlin, J. 1985. Subcellar distribution of hidrolases in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **32**: 616-621.
- Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol. Rev.* **52**: 114-133.
- Marciano-Cabral, F., Cline, M. y Bradley, S. 1987a. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 692-697.
- Marciano-Cabral, F. y Fulford, D. 1986. Cytopathology of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1133-1137.
- Marciano-Cabral, F., Patterson, M., John, D. y Bradley, S. 1982. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J. Parasitol.* **68**: 1110-1116.
- Marciano-Cabral, F., Stanitski, S., Radhakrishna, V. y Bradley, S. 1987b. Characterization of a neutral aminoacyl-peptide hydrolase from *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **34**: 146-149.
- Martínez, A. 1983. Isolation of two strains of *Acanthamoeba culbertsoni* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1405-1412.
- Martínez, A. 1985. *Free-living Amebas: Natural History Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease.* CRC Press, Boca Ratón, Florida. 156 pp.
- Martínez, A. y Amado-Ledo, E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amibas de vida libre. *Protozoología, Epidemiología y Neuropatología. Morfología Normal y Patológica* **B3**: 251-256.

- Martínez, A., Dos Santos, J., Nelson, E., Stamm, W. y Willaert, E. 1977. *Primary amoebic meningoencephalitis*. En: Shedon SS. y Rosen P.P. *Pathology Annual* Parte 2. Vol 12. Appleton-Century, Nueva York: 225-248.
- Martínez, A. y Janitschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; a review. *Infection*. 13: 251-256.
- Martínez, A. y Visvesvara, G., 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598.
- McLaughlin, G., Vodkin, M. y Huizinga, H.1991. Amplication of repetitive DNA for the specific detection of *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 227-230.
- McLaughlin, G., Brandt, F. y Visvesvara, G. 1988. Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected *Naegleria* and *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1655-1658.
- Nerad, T. y Daggett, P. 1979. Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.* 26: 613-625.
- Olomu, N., Martínez, A., Lamarco, K., Nerad, T., Saha, A., Das, S. y Gleu, R. 1986. Demonstration of various acid hidrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 33: 317-321.
- Page, F. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.* 116: 149-184.
- Page, F. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180 pp.
- Page, F. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122 pp.
- Pelandakis, M., De Jonckheere, J. y Pernin, P. 1988. Genetic variation in the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2977-2981.
- Pelczar, J., Reid, D. y Chan, S. 1983. *Microbiología*. Mc Graw Hill, Nueva York. 826 pp.
- Pernin, P., Cariou, M. y Jacquier, A. 1985. Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* 32: 592-603.

- Pernin, P. y De Jonckheere, J. 1992. Appearance in Europe of *Naegleria fowleri* displaying the Australian type of restriction-fragment-length-polymorphism. *Parasitol. Res.* 78 (6): 479-481.
- Pidherney, M., Alizadeh, H., Stewart, G., McCulley, J. y Niederkorn, J. 1993. *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of a pathogenic free living amoebae. *Cancer Letters.* 72: 91-98.
- Puing, H. 1976. *Végétation de la Huasteca, Mexique.* Misión Archeologique et Ethnologique Française au Mexique, París. 534 pp.
- Reilly, M., Marciano-Cabral, F., Bradley, M. y Bradley, S. 1983a. Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *J. Clin. Microbiol.* 17: 576-581.
- Reilly, M., White, K. y Bradley, S. 1983b. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect. Immunity.* 42: 645-652.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-born pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* 74: 65-87.
- Rivera, F., Gallegos, E., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Ortiz, R. y Rodríguez, S. 1991. Félix Dujardin (semblanza histórica). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 42: 13-17.
- Rivera, F., Lares, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Ramírez, P. Y Paulin, A. 1988. Pathogenic Amoebae isolated from the atmosphere of México City and environs. En: Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment. Ed. por Abbou, R. Elsevier Science, Amsterdam: 1175-1179.
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J., Rodríguez, S. y Alcocer, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *J. Environ. Res.* 50: 289-295.
- Rivera, F. y López-Ochoterena, E. 1978. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en especies del género *Naegleria*, Alexeieff (1912), emend Calkins (1913), recolectadas en piscinas, grifos, y reservorios de agua dulce de la Ciudad de México. *Arch. Mex. Anat.* 15: 9-19.
- Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. y Chávez, M. 1992. Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollut.* 61:17-33.

- Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. y Robles, E. 1984a. Pathogenic and free-living protozoa isolated by culture from the nasopharyngeal and oral regions of odontological patients. *J. Environ. Res.* 33: 428-440.
- Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. y Paz, M. 1979. A quantitative, morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* 98: 465-469.
- Rivera, F. Y Paz, E. 1978. Discusión y comentarios sobre los criterios taxonómicos para las amibas del grupo "limas". *Arch. Mex. Anat.* 15: 72-82.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Saldivar, B., Ramírez, P. y Durán, A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *J. Environ. Res.* 62: 43-52.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. y Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming-pool water in Mexico City. *J. Environ. Res.* 32: 205-211.
- Rivera, F., Romero, R. y Medina, F. 1984b. Meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. Med. México* 27: 113-122.
- Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., Chávez, M., Gómez, R., Chio, R. y Islas, J. 1986. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients II. *J. Environ. Res.* 39: 364-371.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. y Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* 42: 149-154.
- Robert, V. y Rorke, L. 1973. Primary amebic encephalitis, probably from *Acanthamoeba*. *Ann. Intern. Med.* 79: 174-179.
- Robinson, B., Christy, P., Hayes, S. y Dobson, P. 1992. *Manual of Analytical Methods. Protozoology*. Reporte No. 39. State Water Laboratory Engineering and Water Supply Departmente, Sidney. 90 pp.
- Rodríguez-Pérez, E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectologia*. 4: 263-266.
- Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Rev. Microbiol.* 20 (3): 225-241.

ESTAS TESIS NO DEBE
SER EN LA BIBLIOTECA

- Rondanelli, E. 1987. *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279 pp.
- Rzedowsky, J. 1978. Vegetación del Estado de San Luis Potosí. *Acta Científica Potosina*. 5: 1-291.
- Scaglia, M., Gatti, S., Bernuzzi, A., Cevini, C., Chichino, G. y Rondanelli, E. 1998. An *in vitro* comparative study on the effect of amphotericine B, econazole, and 5-fluorocytosine on *Naegleria fowleri*, *Naegleria australiensis*, and *Naegleria australiensis* sp. italica. *Microbiologica*. 11: 279-288.
- Schleifer, K. y Stackebrandt, E. 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 143-148.
- Schuster, F. y Rechthano, E. 1975. *In vitro* effects at amphotericine B on growth and ultraestructura of the amoebaflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 591-605.
- Seidel, J., Harmatz, P., Visvesvara, G., Cohen, A., Edwards, J. y Turner, J. 1982. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *New Engl. J. Med.* 306: 346-348.
- Sparangano, O. 1993. Detection of *Naegleria fowleri* cysts in environmental samples by using a DNA probe. *FEMS Microbiol. Lett.* 112 (3): 349-351.
- Sparangano, O. 1993. Differentiation of *Naegleria fowleri* and other *Naegleriae* by polymerase chain reaction and hybridization methods. *FEMS Microbiol. Lett.* 110: 325-330.
- Sparangano, O., Drouet, E., Denoyel, G., Pernin, P. y Ruchsud-Sparangano, M. H. 1994. Differentiation of *Naegleria fowleri* from other species of *Naegleria* using monoclonal antibodies and the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 119-120.
- SPP-INEGI. 1985. *Síntesis Geográfica de San Luis Potosí*. México. 128 pp.
- Steffan, R. y Atlas, R. 1991. Polymerase Chain Reaction: Aplications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 137-161.
- Thong, Y. y Ferrante, A. 1987. Experimental pharmacology. En: *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Ed. por Rondanelli E. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279 pp.

- Tyndall, R., Ironside, K., Metler, P., Tan, E., Hazen, T. y Fliermans, C. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 722-732.
- Valenzuela, G., López-Corella, E. y De Jonckheere, J. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 558-559.
- Van Belkum, A., De Jonckheere, J. y Quint, W., 1992. Genotyping *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2595-2598.
- Van Belkum, A., Homan, W., Limper, L. y Quint, W., 1993. Genotyping isolates and clones of *Giardia duodenalis* by polymerase chain reaction: implications for the detection of genetic variation among protozoan parasite species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 69-77.
- Visvesvara, G., Martinez, A., Schuster, G., Wallace, S., Sawyer, T. y Anderson, M. 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amoebic meningoencephalitis in human and animal. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2750-2756.
- Visvesvara, G., Schuster, F. y Martinez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp., Agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* 40: 504-514.
- Wadowsky, R., Wilson, T., Kapp, N., West, A., Kuchta, J., States, S. Dowling, J. y Yee, R. 1991. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1950-1957.
- Wellings, F., Amuso, S. y Lewis, A. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 661-667.
- Wellings, F., Amuso, S., Lewis, A., Farmelo, M., Moody, D. y Osikowicz, C. 1979. *Pathogenic Naegleria, Distribution in Nature*. Publicación de la Environmental Protection Agency, Cincinnati, EPA/ 600/ 1-79-018.
- Wessbery, K., Skolnick, S., Xu, J., Marciano-Cabral, F. y Kemp, R. 1995. Cloning sequencing and expression of the pyrophosphate-dependent phosphofructa-1-Kinase from *Naegleria fowleri*. *Biochem. J.* 307: 143-149.
- Williaert, E., Jamieson, A., Jadin, J. y Anderson, K. 1974 Epidemiologic and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 54: 333-342.

- Wong, M., Karr, S. y Balamuth, W. 1975. Experimental infections with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate hosts: I. (A) A study on susceptibility to *Naegleria fowleri*. *J. Parasitol.* **61**: 199-208.
- Young, J. y Lowrey, D. 1989. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1077-1083.

VIII. APÉNDICE

a) MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Para aislar a las amebas de vida libre se utilizaron placas de agar no nutritivo con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada. Este medio se conoce como NNE (No Nutritivo con *Enterobacter*). El medio NNE proporciona las sales y la fuente de carbono y a partir de las bacterias, los elementos necesarios para el sostenimiento de las amebas de vida libre. Se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1984).

Medio NNE

NaCl.....	0.120g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.004g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.004g
Na ₂ HPO ₄	0.142g
KH ₂ PO ₄	0.136g
Agar bacteriológico.....	15.0g
Agua destilada.....	1000 ml

El medio NNE se prepara mezclando los componentes en seco y después agregando el agua destilada que se calienta hasta ebullición. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y cuando se ha enfriado un poco se vacían de 15 a 20 ml de agar en placas de Petri previamente esterilizadas. Cuando el agar solidifica, se inocula una solución de bacterias *Enterobacter aerogenes* inactiva. Las bacterias se obtienen cosechándolas a partir de cultivos puros en solución con agua destilada e inactivándola en baño de agua a 70 °C por 30 min.

En las placas con agar se siembran aproximadamente 0.5 ml de la solución de bacterias inactivadas la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con varilla acordada. Las placas de NNE se dejan reposar una hora aproximadamente y se guardan en el refrigerador hasta su uso.

Medio PBSGM (Medio de Chang)

Medio líquido PBSGM (Fosfato, Biotriptasa, Suero, Glucosa Medio, por sus siglas en inglés). Este medio se utiliza para aislar, axenizar y mantener los aislados de amebas de vida libre que hayan crecido en el medio NNE (De Jonckheere, 1984).

Biotriptasa.....	16.6 g
Dextrosa.....	2.7g
Na ₂ HPO ₄	1.5g
KH ₂ PO ₄	0.9g
Agua destilada.....	1000 ml

Esta solución se envasa en tubos con tapón de rosca, vaciando en cada tubo 2.7 ml de medio. Se esterilizan los tubos con el medio a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Después de esterilizado el medio y ya frío, se agregan a cada tubo 0.3 ml de suero fetal de bovino con antibióticos penicilina y kanamicina a una concentración de 200 mg/ml. Los tubos se conservan en refrigeración.

Medio de Nelson para *Naegleria*

Solución de Page

MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.4 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	0.4 mg
Na ₂ HPO ₄	14.2 mg
KH ₂ PO ₄	13.6 mg
NaCl.....	12.0 mg
Agua destilada.....	100.0 ml

A la solución anterior agregar:

Infusión de hígado

(Oxoid o Panmede).....	0.17 g
Glucosa.....	0.17 g

902 Medio axénico de Schuster para *Naegleria*

Extracto de lavadura.....	2.5 g
Peptona.....	2.5 g
Concentrado de hígado Oxoid al 5 %.....	100 ml
Na ₂ HPO ₄ (0.05 M).....	60.0 ml
KH ₂ PO ₄ (0.05M).....	40.0 ml
Agua destilada (aforar).....	1000 ml

Preparar el concentrado de hígado en agua destilada, filtrar o centrifugar a alta velocidad para remover el sedimento y esterilizarlo en autoclave, durante 25 minutos a 121 °C. Agregar el concentrado de hígado filtrado al medio al momento de su preparación. Agregar suero de bovino antes de utilizar el medio.

b) REACTIVOS PARA LA OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR

Amortiguador para Lisis celular

Tris-HCl (pH 8.0).....	10 mM
NaCl.....	100 mM
EDTA (Na ₂).....	100 mM

Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamilo

Fenol (grado biol. mol.).....	250 g
Cloroformo	240 ml
Alcohol isoamilo.....	10 ml
8-Hidroxyquinolina.....	0.5 g

Los cristales de fenol deben ser disueltos con anterioridad, primero con un volumen igual de 1 M Tris-HCl (pH 8.0) y después con otro volumen igual pero en 0.1 M de Tris-HCl también con pH 8.0. Distribuir dentro de frascos de vidrio oscuro, cubrir al fenol con amortiguador TE y mantenerlo alejado de la luz. Almacenar a 4 ° C si su uso es dentro de 2 semanas o a -20 ° C si es dentro de varios meses.

Cloroformo: Alcohol isoamilo

Cloroformo.....	240 ml
Alcohol isoamilo.....	10 ml

Cubrir la solución con agua destilada estéril y almacenar en frascos oscuros a 4 °C fuera del alcance de la luz.

Amortiguador para la electroforesis 10X Tris-borato-EDTA (TBE buffer).

Tris base.....	0.89 M
Acido bórico	0.89 M
EDTA (Na ₂)	0.025 M

Se usa a 0.5X para preparar los geles en agarosa y el amortiguador de la electroforesis.

Amortiguador TE

Tris-HCl.....	10 mM
EDTA.....	1mM

Proteinasa K

Se disuelve en 10 mg/ml en agua bidestilada. Se incuba a 37 °C por 1 hora y se guarda a -20 °C.

Amortiguador para carga de la muestra (gel sample loading buffer).

Sucrosa	20 %
Ficoll.....	10 %
Azul de bromofenol.....	1 %
EDTA (Na ₂), pH 8.0.....	0.1 M

Bromuro de Etidio

Se disuelve el reactivo por toda la noche en una parrilla con agitador magnético a una concentración de 10 mg/ml en agua bidestilada. Se guarda a completa oscuridad a 4 °C. Se agrega 5 µl/100 ml del gel de agarosa para la electroforesis.