

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA *Naegleria fowleri* EN SUJETOS SANOS Y ENFERMOS DE UNA AREA ENDEMIICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRA EN MICROBIOLOGIA
P R E S E N T A :

María Dolores Hernández Martínez

DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL CAMPOS RODRIGUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 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.

Los estudios realizados se llevaron a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la Beca de Maestría con Número de registro 85893.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala (ENEP-I); con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). Proyecto No.IN207994.

Agradecimientos:

A Gabriela Oliver Aguilón por su colaboración y apoyo personal

Al Dr. Rafael Campos Rodríguez, director de tesis

Al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, tutor y revisor del presente trabajo

A los profesores Mineko Shibayama Salas, Maritza Omaña Molina y
Andrés Romero, revisores del mismo

A todas las personas que colaboraron de alguna manera durante la
realización de este proyecto

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas y figuras	iii
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Ciclo de vida y morfología	2
1.2. Relación patógeno- hospedero	3
1.2.1. Signos y síntomas	3
1.2.2. Patología	4
1.2.3. Diagnóstico	4
1.2.4. Tratamiento	5
1.3. Patogenicidad e inmunidad	5
1.3.1. Mecanismos de patogenicidad	6
1.3.1.1. Fagocitosis	6
1.3.1.2. Sustancias citolíticas	6
1.3.1.3. Material citopatógeno de la amiba <i>Naegleria</i>	6
1.3.2. Susceptibilidad y resistencia	7
1.3.3. Respuesta inmune	8
1.4. Antecedentes de trabajo en México	10
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos particulares	11
3. Metodología	12
3.1. Población de estudio	12
3.2. Toma de muestra	12
3.3. Cultivo amibiano axénico	12
3.4. Obtención del extracto amibiano	12
3.5. Cuantificación de anticuerpos anti- <i>Naegleria fowleri</i> en saliva y suero	13
3.5. Análisis estadístico	14
3.7. Detección de proteínas específicas de <i>Naegleria</i> <i>fowleri</i> por la técnica de inmunoblots	14
3.8. Detección de proteínas específicas de <i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> por la técnica de inmunoblots	15

4. Resultados	16
4.1 Población de estudio (Tamaño de muestra)	16
4.2 Cuantificación de anticuerpos anti- <i>Naegleria fowleri</i> en saliva y suero	16
4.3. Análisis estadístico	19
4.4. Detección de proteínas específicas de <i>Naegleria fowleri</i> por la técnica de inmunoblots	23
4.5 Detección de proteínas específicas de <i>Entamoeba histolytica</i> por la técnica de inmunoblots	30
5 Discusión	38
5.1 Presencia de anticuerpos anti- <i>Naegleria fowleri</i> en muestras de suero y saliva	38
5.1.1. Anticuerpos IgA	38
5.1.2. Anticuerpos IgM	39
5.1.3. Anticuerpos IgG	40
5.1.4. Anticuerpos anti- <i>Naegleria fowleri</i> en el grupo de enfermos	41
5.2. Detección de proteínas específicas por la técnica de inmunoblots	42
5.2.1 Anticuerpos IgA	43
5.2.2 Anticuerpos IgM	44
5.2.3 Anticuerpos IgG	45
6 Conclusiones	46
7 Bibliografía	47
8 Apéndice	52

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1 Número de muestras obtenidas para cada grupo de estudio	16
Tabla 2 Número y porcentaje de muestras de saliva consideradas positivas acorde al nivel de anticuerpos anti- <i>N. fowleri</i> .	16
Tabla 3 Número y porcentaje de muestras de suero consideradas positivas acorde al nivel de anticuerpos anti- <i>N. fowleri</i> .	17
Tabla 4 Análisis de varianza entre los grupos de estudio para las tres globulinas valoradas	19
Tabla 5 Prueba de Fisher de comparación múltiple de medias entre los valores obtenidos para cada globulina, en cada grupo de estudio y para cada muestra obtenida.	22
Tabla 6 Comparación de los niveles de anticuerpos para <i>N. fowleri</i> y <i>E. histolytica</i> en el grupo de referencia	23
Tabla 7 Proteínas de <i>N. fowleri</i> con mayor frecuencia de reconocimiento por los anticuerpos específicos	25
Tabla 8 Proteínas de <i>E. histolytica</i> más frecuentemente reconocidas por los anticuerpos específicos	31
Tabla 9 Comparación de las proteínas reconocidas de <i>Naegleria fowleri</i> y <i>Entamoeba histolytica</i> por los anticuerpos en estudio.	32
Figura 1 Anticuerpos IgA anti- <i>Naegleria fowleri</i> en suero y saliva de los tres grupos de estudio.	18
Figura 2 Anticuerpos IgM anti- <i>Naegleria fowleri</i> en suero y saliva de los tres grupos de estudio	20
Figura 3. Anticuerpos IgG anti- <i>Naegleria fowleri</i> en suero y saliva de los tres grupos de estudio.	21
Figura 4 Perfiles proteicos electroforéticos de las cepas en estudio	24
Figura 5 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de <i>N. fowleri</i> en muestras de suero de los tres grupos de estudio.	26
Figura 6 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de <i>N. fowleri</i> en muestras de saliva de los grupos de donadores y enfermos	27
Figura 7 Análisis de inmunoblots de Ac IgM contra antígenos de <i>N. fowleri</i> en muestras de suero de los tres grupos de estudio	28
Figura 8 Análisis de inmunoblots de Ac IgG contra antígenos de <i>N. fowleri</i> en muestras de suero de los grupos de donadores y enfermos	29
Figura 9 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de <i>E. histolytica</i> en muestras de suero de los tres grupos de estudio	33
Figura 10 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de <i>E. histolytica</i> en muestras de saliva de los tres grupos de estudio	34
Figura 11. Análisis de inmunoblots de Ac IgM contra antígenos de <i>E. histolytica</i> en muestras de suero de los tres grupos de estudio.	35
Figura 12. Análisis de inmunoblots de Ac IgM contra antígenos de <i>E. histolytica</i> en muestras de saliva del grupo de referencia.	36
Figura 13 Análisis de inmunoblots de Ac IgG contra antígenos de <i>E. histolytica</i> en muestras de suero de los tres grupos de estudio	37

RESUMEN

Naegleria fowleri es una ameba de vida libre que causa meningoencefalitis con desarrollo rápido y fulminante en el hombre. Amebas de vida libre patógenas han sido aisladas en cuerpos de agua naturales y recreativas en el estado de San Luis Potosí.

Poco se sabe de la respuesta de anticuerpos que puede estar operando para estas amebas, y por lo tanto, el estudio de una población donde la localización de estos microorganismos es endémica puede contribuir a esclarecer las características e importancia de la respuesta humoral específica.

Con el objeto de evaluar la presencia de anticuerpos anti- *Naegleria fowleri* en muestras de saliva y suero e identificar las proteínas amebianas más frecuentemente reconocidas por los anticuerpos específicos, se seleccionaron tres grupos de estudio: sujetos sanos del área endémica (donadores), enfermos de la misma zona, y un grupo de personas sanas externo al área endémica (referencia). Se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG, IgM e IgA anti- *Naegleria fowleri* a través de la técnica de ELISA. Las muestras consideradas positivas se utilizaron para conocer los antígenos amebianos más frecuentemente reconocidos aplicando la técnica de Inmunoblot (Western blot).

El análisis de varianza de los niveles de globulinas valoradas en los grupos de estudio corroboró la idea de que la respuesta de anticuerpos específicos es diferente en los tres grupos de estudio. Observándose además, que la respuesta sérica para las tres clases de anticuerpos en estudio fue mayor en el grupo de enfermos. En cuanto a la respuesta secretoria, los niveles de IgA fueron mayores en el grupo de enfermos y los de IgM en el grupo de sujetos sanos del área endémica (gpo. de donadores).

Las proteínas amebianas que reaccionaron con los anticuerpos en estudio, fueron reconocidas con diferente frecuencia entre: grupos de estudio, ambas muestras utilizadas y por clase de globulina determinada. Coincidiendo además en el peso molecular algunas de las proteínas de *Naegleria fowleri* con las de *Entamoeba histolytica*.

De las proteínas de *Naegleria fowleri* reconocidas con mayor frecuencia algunas podrían corresponder a moléculas asociadas a cepas patógenas que han sido reportadas por otros autores.

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* son capaces de causar enfermedades en el hombre y en otros animales. Estas amibas normalmente viven como fagótrofos en estanques, ríos, lagos y en el suelo alimentándose de bacterias. Sin embargo, como oportunistas pueden producir serias infecciones del sistema nervioso central (SNC) y de los ojos. Así, el término anfitriónicas ha sido propuesto para denominar este pequeño grupo de amibas que tienen la habilidad de vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos (Page, 1974).

N. fowleri es responsable de una infección rápida y fatal en el SNC denominada meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP). Algunas especies del género *Acanthamoeba* pueden producir una infección crónica del SNC conocida como encefalitis amibiana granulomatosa (EAG); además de la infección ocular a nivel de córnea (Martínez, 1985). Recientemente se reportó a *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp. como el agente causal de encefalitis en humanos y animales (Visvesvara y col., 1993).

El presente trabajo se centra en el estudio de anticuerpos (Ac) específicos contra *N. fowleri*, por tanto, la introducción y antecedentes se limitan a esta especie, así como al padecimiento que provocan.

1.1 CICLO DE VIDA Y MORFOLOGÍA.

Las amibas del género *Naegleria* están ampliamente distribuidas en el suelo y en cuerpos de agua dulce; su ciclo de vida presenta dos estadios comunes: una fase de alimentación y división celular denominada trofozoíto, o amiba; una de resistencia llamada quiste y una peculiar y transitoria fase flagelada. Las amibas se enquistan cuando las condiciones no son apropiadas y exquistan en ambientes favorables.

Los trofozoítos de las diferentes especies de *Naegleria* son similares en apariencia y son conocidos como amibas limax, de la palabra latina que significa babosa. Estas amibas son elongadas, con movimiento dirigido por un pseudópodo como eruptivo llamado lobopodo.

El trofozoíto de *N. fowleri* en actividad mide en promedio 22 μm de longitud, y su forma redondeada inactiva con un promedio entre 9 y 15 μm de diámetro (Carter, 1970).

Los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. australiensis* (especie patógena solo experimentalmente) poseen estructuras fagocíticas distintivas llamadas amebostomas (John y col., 1984). Los amebostomas son usados para engullir y varían en número de 1 a 12 por ameba, dependiendo de la cepa. Las amebas de las especies no patógenas de *Naegleria* tienen estructuras modificadas semejantes que no son tan claramente definidas ni tan numerosas como los amebostomas de *N. fowleri*. Sin embargo, no parece haber correlación entre el grado de virulencia y el número de amebostomas presentes; aunque sí podrían estarlo con la patogenicidad pues solo las dos especies patógenas del género tienen amebostomas distintivos (John y De Jonckheere, 1985).

Estructuras de alimentación semejantes están presentes en *Entamoeba histolytica* (González-Robles y Martínez-Palomo, 1983).

La forma flagelar transitoria de *N. fowleri* se obtiene cuando la ameba es suspendida en agua destilada o en solución no nutritiva; su forma típica es una célula elongada roma con dos flagelos que emergen del rostrum anterior. (Fulton, 1977).

Los quistes de *N. fowleri* son esféricos, frecuentemente unidos en masa, y con un diámetro entre 7 y 15 μm (Carter, 1970). El examen de los quistes al microscopio electrónico revela un promedio de dos poros de tapón mucoso u ostiolo por quiste, con pared relativamente delgada (Schuster, 1975); característica que hace a los quistes de *N. fowleri* muy susceptibles a la desecación.

1.2 RELACIÓN PATÓGENO- HOSPEDERO.

1.2.1. SIGNOS Y SÍNTOMAS

La MEAP ocurre típicamente en niños saludables o adultos jóvenes con historia reciente de natación en piscinas o cuerpos de agua dulce. La enfermedad es fatal, produciendo usualmente la muerte dentro de las 72 horas después del inicio de los síntomas. La infección continúa a la inhalación intranasal de agua que contiene amebas o flagelados. La ameba penetra la mucosa nasal, la placa cribosa y viaja a través de los nervios olfatorios al cerebro. Las amebas primero invaden los bulbos olfatorios desde donde se diseminan a las regiones posteriores del cerebro. En el cerebro provocan inflamación y causan destrucción masiva del tejido (Carter, 1970; Martínez, 1985).

El curso clínico es dramático. Los síntomas comienzan con severo dolor de cabeza en el área frontal, fiebre (39°- 40° C) y anorexia; seguido por náuseas, vómito y

signos de irritación meníngea. Al invadir los lóbulos olfatorios pueden causar disturbios en el sentido del olfato y el gusto. El paciente puede perder la razón antes de entrar al estado de coma (Martínez, 1985).

1.2.2. PATOLOGÍA.

Los hallazgos patológicos en MEAP son constantes. Los hemisferios cerebrales están usualmente edematosos. Las meninges están difusamente hiperémicas con un ligero exudado purulento. La corteza contiene muchos focos hemorrágicos superficiales. Hay severas complicaciones de los bulbos olfatorios con hemorragia, necrosis y exudado purulento.

Los exámenes microscópicos revelan una gran cantidad de amibas en los espacios perivascular y subaracnoideo. Presumiblemente, el espacio perivascular sirva de vía de migración a las amibas, y los vasos sanguíneos proporcionen el oxígeno necesario para estos organismos aerobios. Un pequeño número de amibas se observa agrupado en el tejido cerebral y en el exudado purulento de las meninges y el tejido cerebral. En el exudado algunas amibas se pueden observar fagocitadas por macrófagos. Muchas amibas contienen fragmentos celulares y eritrocitos. El exudado purulento contiene numerosos polimorfonucleares y mononucleares.

La materia gris cortical es el sitio preferido para el desarrollo de las amibas; por tanto, se presentan severas complicaciones en los hemisferios cerebrales, cerebelo, tallo cerebral y la porción superficial de la médula espinal. La infección del SNC con *N. fowleri* puede ser descrita como una meningoencefalitis aguda, hemorrágica, necrotizante (Martínez, 1985).

1.2.3. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de MEAP se realiza por identificación al microscopio de amibas vivas o teñidas a partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente. Las amibas móviles se observan rápidamente en preparación en fresco mostrando su forma limax característica. La refrigeración del líquido cefalorraquídeo no es recomendada a causa de que ésta puede dañar a las amibas.

Los frotis de LCR pueden ser teñidos con Wright o Giemsa mostrando a las amibas como células con una cantidad considerable de citoplasma azul cielo con un núcleo relativamente pequeño, teñido de rosa. Los leucocitos mononucleares de manera opuesta se observan con un gran núcleo púrpura y una pequeña cantidad de citoplasma azul cielo (Benson y col., 1985).

Las amibas pueden ser cultivadas si se inocula un poco de LCR sobre un agar no nutritivo enriquecido con *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* e incubado a 37° C.

Clínicamente la MEAP es muy semejante a una meningitis bacteriana fulminante y los hallazgos en el laboratorio son similares. El LCR es purulento o sanguinopurulento con leucocitos, predominantemente neutrófilos, en un rango de

unos cientos hasta 20,000 cél/ mm². Los niveles de glucosa en el LCR son bajos, y generalmente se incrementan las proteínas (Martínez, 1985).

La mayoría de los casos han sido diagnosticados después de la hospitalización del paciente o bien *post mortem*.

1.2.4. TRATAMIENTO.

En la actualidad no existe un tratamiento satisfactorio contra la MEAP. Los antibióticos utilizados en las meningitis bacterianas no son efectivos en la infección por *Naegleria*, así como las drogas amebicidas. La anfotericina B, una droga considerablemente tóxica, es el agente del cual hay evidencias de efectividad clínica. Los primeros casos de sobrevivientes conocidos fueron tratados con anfotericina B, administrada intravenosa e intratecalmente (Anderson y Jameson, 1972).

Pruebas *in vitro* en una cepa altamente virulenta de *N. fowleri* aislada de humano demostraron que las amibas son extremadamente susceptibles a la anfotericina B (concentración mínima inhibitoria MIC, 0.15 µg/ml) poco sensibles a miconazol (MIC, 25 µg/ml), y resistentes a rifampicina (MIC, 100 µg/ml) (Stevens y col., 1981).

La anfotericina B es un compuesto polieno que actúa sobre la membrana plasmática, modificando su permeabilidad selectiva (Kobayashi and Medoff, 1977). Éste medicamento se administra intravenosamente a altas dosis: 1-1.5 mg por kg. de peso corporal diariamente por 3 días y posteriormente 1 mg/kg./día por seis días. Adicionalmente, la anfotericina B puede ser administrada intratecalmente, y el miconazol es administrado intravenosamente (Carter, 1972; Seidel y col., 1982). Sin embargo entre los antimicóticos disponibles actualmente, la anfotericina B es el más difícil de administrar y tiene muchos efectos colaterales.

Las cantidades terapéuticamente activas del fármaco (anfotericina B), casi siempre alteran la función renal y hepatocelular, originando anemia. También se presentan a menudo disminución en la presión arterial similar a la del choque, trastornos electrofisiológicos y diversos síntomas neurológicos; además de ocasionar escalofríos, fiebre, vómito y dolor de cabeza (Katzung, 1996).

1.3. PATOGENICIDAD E INMUNIDAD

Los determinantes de virulencia e inmunidad durante la infección con amibas de vida libre no son del todo claros; los trabajos que se han realizado con *N. fowleri* han sido básicamente en cultivos celulares y en animales de laboratorio.

1.3.1. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Los mecanismos de citopatogenicidad propuestos para *N. fowleri* incluyen la fagocitosis, la liberación de sustancias citolíticas, y la presencia de un componente biológicamente activo, NACM (Material citopatógeno de la amiba *Naegleria*).

1.3.1.1. Fagocitosis: La fagocitosis es una función básica de la amiba y una de las causas de la destrucción celular, tanto en cultivos celulares como en tejido humano, y por tanto esta íntimamente relacionada con la patogénesis. La actividad fagocítica de *N. fowleri* en cultivos celulares ha sido descrita por diferentes autores: Brown (1979b) llamó trogocitosis al englobamiento de un fragmento de células de embrión de ratón por ésta amiba. John y colaboradores (1985) nombraron amebostomas a las estructuras mediante las cuales se realiza la trogocitosis. Como se han observado amebostomas en la superficie amibiana en cortes de tejido, y ellos engloban células en cultivo, se presume su participación en los mecanismos de patogenicidad. La inhibición de la fagocitosis por citocalisina B inhibió también la citopatogenicidad de *N. fowleri* in vitro (Brown, 1979a).

1.3.1.2. Sustancias citolíticas: El efecto citopático de *N. fowleri* sobre células de mamífero en cultivo ha sido atribuido a sustancias secretadas en el medio de cultivo por la amiba. Chang (1974) reportó que el sobrenadante del medio donde crece *N. fowleri* induce degeneración en células de mamífero cuando se adiciona a cultivos frescos, sugiriendo que la amiba había secretado sustancias citolíticas o citotóxicas. Posteriormente concluyó que el efecto citopático de esta amiba podría ser atribuido a una enzima fosfolipolítica liberada por la amiba durante su crecimiento (Chang, 1978).

Varias fosfolipasas (fosfolipasa A, lisofosfolipasa y esfingomielinasa) se han identificado en medios de cultivo donde fue crecida la amiba (Curson y col., 1978; Hysmith y Franson, 1982a,b). La actividad de los medios de cultivo de *Naegleria* patógena fueron mayores que de los cultivos de *Naegleria* no patógena (Curson y col., 1978). Los fosfolípidos de la mielina humana son degradados por el sobrenadante del cultivo amibiano (Hysmith y Franson, 1982b). La neuroaminidasa presente en el medio de cultivos de *N. fowleri* hidrolizó mucina y mielina humana (Eisen y Franson, 1987). Quizá estas enzimas que son capaces de actuar in vitro son también las responsables de la extensa desmielinización que ocurre en la MEAP experimental (Chang, 1979) y humana (Duma y col., 1971).

1.3.1.3. Material citopatógeno de la amiba *Naegleria* (NACM): El NACM se aísla de lisados amibianos por centrifugación, filtración y liofilización; atribuyéndosele un efecto citopático. Este material se ha obtenido de *N. fowleri*, *N. gruberi* y *N. jadini* pero no del género *Acanthamoeba* (Dunne-Backe y Dixon, 1989).

El NACM mata células de varias líneas celulares tanto de aves como de mamíferos. Después de que los cultivos son inoculados, hay un largo periodo de

latencia (4 a 10 días) seguido por un periodo corto (menos de 24 hrs) durante el cual la monocapa es destruida. El efecto citopático ha sido mantenido en cultivos celulares a través de nueve pases seriados (Dunne-Backe y Schuster, 1985). El NACM crudo, así como purificado, causa efecto citopático en células en cultivo. El NACM es una proteína con un peso molecular de 36,000 daltones y un punto isoeléctrico de pH 4.2. Ac monoclonales contra el NACM previenen su actividad citopática. Tinciones fluorescentes muestran que este material se localiza en los extremos de los pseudópodos amibianos y en el citoplasma periférico; observándose las estructuras con formas de anillos que semejan amebostomas (Dunne-Backe y Dixon, 1989).

1.3.2. SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA

Los factores responsables de la susceptibilidad y la resistencia innata a las infecciones por *N. fowleri* no están aún bien definidos. El número de infecciones humanas es relativamente bajo en relación al gran número de individuos que deben haberse expuesto a estas amibas.

Ac contra amibas de vida libre se han detectado en el suero de humanos sanos. En ellos los Ac séricos aglutinantes han sido evaluados contra *N. australiensis*, *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi* (Marciano-Cabral y col., 1987; Reilly y col., 1982, 1983). La actividad aglutinante fue específica para cada especie, indicando que estas personas han sido expuestas a cada una de estas especies de *Naegleria*. Curson y colaboradores (1980) valoraron la presencia de Ac anti- *N. fowleri* en 93 muestras de suero por la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes y encontraron a todas positivas, con títulos entre 1:5 a 1:20. Dubray y col. (1987), mediante un ensayo de peroxidasa de rábano, con avidina-biotina detectaron Ac anti- *N. fowleri* y anti- *N. lovaniensis* en el 88% de las 115 muestras de suero de pacientes de un hospital. Los Ac fueron identificados como IgM e IgG, con títulos de IgG en el rango de 1:20 a 1:640.

Aparentemente la amplia ocurrencia de Ac contra especies del género *Naegleria* en suero humano puede reflejar la distribución global de estos organismos, o puede representar Ac de reacción cruzada a antígenos no determinados.

El suero de una víctima de MEAP en Nueva Zelanda tenía niveles bajos de IgA aunque los niveles de IgM e IgG fueron normales (Curson y col., 1979). Sin embargo, un reporte de Inglaterra describe niveles normales de IgA en el suero de un niño que murió de infección por *Naegleria* (Cain y col., 1979). En ambos casos se midió la IgA sérica pero no la IgA secretoria; por lo tanto, como *N. fowleri* invade la mucosa nasal, es razonable sugerir que la IgA secretoria juegue un papel en la protección a esta infección.

A nivel experimental en ratones se ha observado que la edad afecta de manera dramática en la infección. Los ratones jóvenes son susceptibles de manera uniforme, pero al crecer son más resistentes a la infección. Además, las hembras son más resistentes a la infección que los machos de la misma edad (Haggerty and John, 1978). Curiosamente, las víctimas de MEAP han sido más hombres que mujeres; aunque esto ha sido atribuido a los hábitos más comunes de natación e inmersión por este sexo, aumentando así la probabilidad de exposición (John, 1993).

Los únicos animales susceptibles a la infección experimental por *N. fowleri* a través de una simple instilación intranasal son los roedores (Young y col., 1980).

1.3.3. RESPUESTA INMUNE

El conocimiento sobre la respuesta inmune contra las amibas de vida libre en poblaciones humanas es muy escaso; excepto por los estudios serológicos mencionados anteriormente. La información sobre esta respuesta se basa principalmente en estudios a nivel experimental.

Se han realizado varios trabajos en los que se han inmunizado ratones con *N. fowleri*, probando diferentes vías y dosis, encontrándose porcentajes de protección muy variados. De manera general, no se ha logrado una inmunidad sólida. La excepción fue un procedimiento de inmunización que se realizó con una fracción del sobrenadante de un cultivo de *N. fowleri* el cual fue inoculado intraperitonealmente cinco veces. En este ensayo se obtuvo 100 % de protección (Thong y col., 1980). Thong y col. en 1979 establecieron que el antígeno del sobrenadante del medio de cultivo es un componente de superficie de la membrana plasmática de la amiba (Ferrante, 1991). Otro trabajo notable fue publicado por Bush y John (1988) realizaron inoculaciones intranasales múltiples con *N. gruberi* y *N. fowleri* vivas obteniendo 88 y 65 % de protección, respectivamente. *N. gruberi*, que es una especie no patógena, parece ser mejor inmunógeno que *N. fowleri*; por tanto, se puede pensar que la exposición a esta amiba más abundante en el ambiente, ofrezca alguna protección a la infección por *N. fowleri* que podría ser letal.

A pesar de que se ha detectado la presencia de Ac contra estas amibas no se ha demostrado su actividad protectora.

Los niveles de inmunoglobulinas séricas se incrementan de 2 a 4 veces en ratones inoculados con *N. fowleri* intranasalmente tres veces y de 2 a 6 veces en inoculaciones intravenosas. El mayor incremento se presenta en IgG seguido por IgM e IgA. Estos Ac mostraron capacidad aglutinante, reducción en la viabilidad amibiana y en su virulencia (Haggerty y John, 1982). Sin embargo, cuando las tres clases de globulinas fueron transferidas a ratones infectados con *N. fowleri*, solo la IgG confirió protección (Ferrante y Rowan-Kelly, 1988). No obstante que *N.*

fowleri es capaz de formar un capping e internalizar los Ac unidos a su superficie (Ferrante y Thong, 1979).

También se ha observado que el suero humano normal provoca la lisis de estas amibas a través de la activación de la vía alterna del complemento (Rowan-Kelly y col., 1983). Cuatro especies del género son susceptibles: *N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. gruberi* y *N. lovaniensis* (Whiteman y Marciano-Cabral, 1987). Cepas altamente virulentas de *N. fowleri* son resistentes a la lisis por el complemento. En contraste, cepas de baja virulencia o no patógenas de *Naegleria* spp. al activar el complemento son lisadas rápidamente. Esta resistencia al proceso de lisis está asociada a glicoproteínas (GP1) presentes en la superficie de cepas patógenas y ausente en no patógenas (Toney y Marciano-Cabral, 1992). Además, ésta amiba usa vesiculaciones de la membrana para remover proteínas del complemento depositadas sobre ella, específicamente el complejo de ataque a membrana C5b-C9 (Toney y Marciano-Cabral, 1994).

El papel de la inmunidad celular contra *N. fowleri* fue examinada en conejillos de indias por Curson y colaboradores en 1980b. Los resultados de la prueba cutánea en los conejillos mostró una marcada respuesta de hipersensibilidad a los antígenos de *Naegleria* homólogos y heterólogos. Además, la prueba *in vitro* de inhibición de macrófagos positiva confirmó la presencia de inmunidad mediada por células en animales infectados con *Naegleria*. Ferrante y col. en 1988 reportaron reducción en la inmunidad a *N. fowleri* en ratones depletados de neutrófilos por tratamiento con Ac monoclonales y sugieren que los neutrófilos son necesarios para la expresión de la inmunidad a éstas amibas (John, 1993).

Algunos grupos de investigación han estudiado las interacciones *in vitro* de *N. fowleri* con macrófagos y neutrófilos. Por ejemplo, Fischer-Stenger y col. en 1990 y 1992 trabajaron con macrófagos de peritoneo de ratón activados *in vivo* con BCG o *Propionibacterium acnes* y retados con lipopolisacárido *in vitro* exhibiendo considerable actividad amebicida contra *N. fowleri*. Ferrante y Thong en 1980 reportaron que neutrófilos de ratón inmunizados con *N. fowleri* son capaces de matar amibas *in vitro*. Algunos neutrófilos rodean una amiba y la destruyen, mediante el contacto y liberación de enzimas. Ferrante y Smith en 1984 observaron que extractos de *N. fowleri*, pero no de *N. gruberi* o *A. culbertsoni*, contienen factores que son mitógenos para linfocitos T de ratón (op. cit.).

Ferrante y col. en 1987 reportaron que neutrófilos humanos matan a *N. fowleri* solamente después de haber sido expuestos al medio de cultivo de leucocitos mononucleares estimulados con fitohemaglutinina. Neutrófilos carentes de mieloperoxidasa, pero con actividad respiratoria normal, no pueden ser inducidos por el medio de leucocitos mononucleares a matar a *N. fowleri*. Lo anterior sugiere que la mieloperoxidasa está involucrada en la destrucción amibiana. Ferrante y col. en 1989 encontraron que los neutrófilos de ratón inmunizados

contra *N. fowleri* tienen mayores niveles de actividad respiratoria que los neutrófilos de ratones normales (Ferrante, 1991).

1.4. ANTECEDENTES DE TRABAJO EN MÉXICO

En México, desde la década de los 80's Rivera y colaboradores han realizado diversos trabajos relacionados con amibas de vida libre. Aislaron amibas arizoicas de cuerpos de agua recreativas (Rivera y col., 1983) y naturales (Rivera y col., 1989a); a partir de la atmósfera (Rivera y col., 1987, 1994; Rodríguez-Zaragoza y col., 1993); y de casos clínicos (Rivera y col., 1989b; 1989c; Omaña, 1995; Centeno y col., 1996). Así como de la región oral y nasofaríngea de pacientes dentales (Rivera y col., 1986).

Hasta hoy, en nuestro país existen reportados 12 casos bien documentados y otros 30 posibles de meningoencefalitis amibiana en humanos. La importancia de estas amibas como agentes causales de enfermedades en humanos no es bien conocida, y es probable que algunos de los casos de meningoencefalitis registrada como de etiología desconocida hayan sido causados por estas amibas.

La zona de la Huasteca por tener gran riqueza de recursos acuáticos, utilizados como centros de recreo, resultó ser un reservorio ideal para las amibas de vida libre. En un estudio realizado en las ciudades de San Luis Potosí y Ciudad Valles se aislaron amibas de vida libre, de las cuales algunas cepas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* fueron patógenas a nivel experimental; los aislamientos se realizaron tanto en cuerpos de agua naturales como albercas medicinales o de uso recreativo (Ortiz y col., 1993).

En base a estos estudios se decidió realizar un trabajo con la población de ésta zona, donde *N. fowleri* ha sido aislada, con el propósito de monitorear la presencia de Ac específicos a nivel sérico y secretorio e identificar las moléculas antigénicas que las generan; para lo cual se establecieron vínculos de cooperación con los principales centros hospitalarios de la región, que incluyen las clínicas del IMSS, el ISSSTE y el Hospital regional de Cd. Valles. Hospitales que proporcionaron las muestras de suero y saliva tanto de personas sanas, como de enfermos a los que pudieran estar asociadas estas amibas. Tomando como objetivo principal, que el presente estudio permita vislumbrar el papel que juegan los Ac secretorios en la defensa contra este protozoario.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de anticuerpos anti- *Naegleria fowleri* en secreción salival, así como en el suero de sujetos sanos y de sujetos con varios padecimientos en un área endémica.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las muestras de suero y saliva de los grupos de estudio.
- Determinar la presencia de anticuerpos anti- *Naegleria fowleri* en las muestras obtenidas mediante un ensayo inmunoenzimático.
- Identificar por inmunoblots las proteínas de *Naegleria fowleri* más frecuentemente reconocidas por los anticuerpos específicos.

3. METODOLOGÍA

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Grupo de enfermos: Personas de la ciudad de San Luis Potosí y Ciudad Valles con padecimientos a los que pudiera estar asociada *Naegleria fowleri*.

Durante el tiempo de colecta no se presentó ningún caso de MEAP. Las muestras que conforman el grupo corresponden a personas con padecimientos de rinitis, bronconeumonía, tuberculosis y con diagnóstico no determinado.

Grupo de donadores: Personas sanas de las mismas ciudades del estado de S.L.P. que acudieron a donar sangre a los hospitales con los que había convenio.

Grupo de referencia: Personas sanas de una localidad ajena al área endémica, que se utilizaron como grupo comparativo por sus niveles de anticuerpos específicos.

3.2. TOMA DE MUESTRA.

Saliva: Se colectaron aproximadamente 5 mililitros de saliva total después de estimular su producción por masticación de un trozo de parafilm, y se adicionó un poco de azida de sodio para su preservación. Las muestras se mantuvieron en congelación hasta su uso.

Suero: Se colectaron 5 mililitros de sangre periférica. Se separó el suero y se mantuvo en congelación hasta su uso.

3.3. CULTIVO AMIBIANO AXÉNICO.

La cepa amibiana de *Naegleria fowleri* ATCC (30808) (aislada de un caso clínico), se hizo crecer en botellas de cultivo en medio de bactocasitona (2%) enriquecido con suero de bovino neonato (10%), hasta alcanzar la formación de monocapa, fase en la que se cosecharon las células.

3.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO AMIBIANO.

Después de formada la monocapa en los cultivos amibianos, las células se cosecharon y se concentraron por centrifugación a 2,500 r.p.m. durante 10 minutos, y se realizó un lavado con solución salina isotónica (todo el proceso se realizó en frío). Posteriormente se adicionó el inhibidor de proteasas ácido p-hidroximercuriobenzoico (8mM). Finalmente el paquete celular se sometió a 4 ciclos de congelación y descongelación para promover su ruptura. El extracto amibiano se distribuyó en alícuotas de 200 microlitros y después de cuantificar la

concentración de proteínas por el método de Bradford se mantuvo en congelación a -70°C (Bradford, 1976).

3.5. CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS Anti-*N. fowleri* EN SALIVA Y SUERO.

Apartir de las muestras obtenidas de los tres grupos de estudio se cuantificaron los Ac de las clases IgA, IgM e IgG anti- *N. fowleri* a diluciones de 1:2 para las muestras de saliva y de 1:100 para las de suero. La cuantificación de Ac se realizó por la técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assays) bajo las siguientes condiciones:

Las placas se sensibilizaron con $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto amibiano total en regulador de recubrimiento, y después de incubar durante 18 horas a 4°C se lavaron 3 veces con PBS-T (pH 7.2- 0.05 % tween 20); posteriormente se bloquearon con caseína (1%) en PBS, incubándose por una hora a 37°C . En seguida se lavaron 3 veces con la misma solución y se añadieron las muestras de saliva o suero, utilizando como diluyente PBS-T y se incubaron por 18 horas a 4°C . Al final de este periodo las placas se lavaron 10 veces con PBS-T y se agregó el conjugado de cabra anti- IgG, IgM o IgA humana marcado con peroxidasa diluido 1: 10,000 en PBS y con 5 % de leche descremada. Al término de una hora de incubación a 37°C se lavaron las placas por 6 ocasiones con PBS-T y se adicionó el sustrato en una solución reguladora que contenía también el cromógeno correspondiente. Después de 15 minutos a temperatura ambiente se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 M y se determinó la densidad óptica (absorbancia a 492 nm). El volumen utilizado de cada uno de los reactivos para cada pozo fue de 100 microlitros. Cada una de las muestras se trabajó por duplicado.

Los reactivos y soluciones utilizados se describen en detalle en el apéndice I.

El valor de corte para cada clase de globulina detectada (IgA, IgM o IgG), y en cada tipo de muestra utilizada (suero o saliva) se calculó en base a los datos correspondientes obtenidos de las muestras del grupo de referencia; debido a que en teoría las personas de este grupo no han tenido un contacto tan cercano con estas amibas en comparación con las personas del área endémica, por tanto sus niveles de Ac específicos son considerados como referencia. Valores que sirvieron para considerar a las muestras como positivas o negativas, tanto pertenecientes a este grupo como a los grupos restantes.

El valor de corte se obtuvo sumando a la media de cada conjunto de datos, el valor correspondiente a dos desviaciones estándar (Sathar, 1990):

$$\text{valor de corte} = \bar{x} + 2\sigma_{n-1}$$

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un análisis de Varianza entre los tres grupos de estudio para las tres globulinas valoradas; y posteriormente se hizo una Prueba de Fisher de comparación múltiple de medias.

De manera adicional se correlacionaron los niveles de Ac anti-*N. fowleri* contra los niveles anti-*Entamoeba histolytica* en el grupo de referencia.

3.7. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE *Naegleria fowleri* POR LA TÉCNICA DE INMUNOBLOTS.

La técnica de inmunoblots (Western blot) se realizó utilizando las muestras de suero y/o saliva consideradas positivas (acorde al valor de corte), en los diferentes grupos de estudio; lo que permitió detectar por su peso molecular las proteínas amibianas reconocidas de forma específica por los Ac evaluados.

El extracto de *N. fowleri* se procesó en amortiguador de tratamiento y se colocó en baño maría durante 90 segundos. La electroforesis se realizó con base en el sistema de Laemmli de acuerdo al manual de uso de la unidad Mighty Small (SE 250 de Hoefer) en el cual el gel separador esta a una concentración de acrilamida de 10% T, 2.7% C, y el gel concentrador a una concentración de 4% T, 2.7% C. Las condiciones del corrimiento utilizando el amortiguador correspondiente fueron 20 mA durante una hora. Se utilizaron 15 µg de proteína por carril; colocando siempre en el primer carril el marcador de peso molecular.

Las proteínas ya separadas por su peso molecular se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a corriente constante (400 mA), utilizando el tanque de transferencia TE 22 de Hoefer y el amortiguador correspondiente, durante 90 minutos.

Para verificar el corrimiento electroforético y la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se utilizaron las tinciones con azul de Coomassie y con rojo de Ponceau, respectivamente.

Para realizar la inmunodetección la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se cortó en tiras y cada una de ellas se bloqueó con leche descremada al 5% en una solución de PBS (pH 7.2) por una hora. Después de un lavado con PBS-T durante 5 minutos las tiras fueron colocadas en una solución de PBS-T que contenía las muestras de suero o saliva a diluciones de 1:100 o 1:2, respectivamente e incubadas por dos horas. Nuevamente las tiras se lavaron en tres ocasiones en PBS-T por 10 minutos y se adicionó el conjugado de cabra anti IgA,

IgM o IgG humana marcado con peroxidasa en una dilución 1:1000 e incubados por una hora . Finalmente, y después de lavar de igual manera las tiras, éstas se colocaron en la solución reveladora que contiene el sustrato y cromógenos correspondientes, hasta que las bandas fueron visualizadas (15 minutos aproximadamente). Todo el proceso se realizó en agitación constante y a temperatura ambiente.

Los reactivos y soluciones utilizados en esta técnica se muestran en el apéndice II.

3.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE *Entamoeba histolytica* POR LA TÉCNICA DE INMUNOBLOTS.

De manera adicional algunas de las muestras positivas fueron también utilizadas en esta técnica con extractos de *E. histolytica*, para comparar las moléculas inmunoreactivas en ambas especies.

En la tabla 2 se observa que el número de muestras de saliva consideradas positivas fue escaso en los tres grupos de estudio, siendo la excepción en los Ac IgA en el grupo de enfermos, donde el 60% resultó positivo. Un dato interesante también es el número de muestras positivas en el grupo de donadores para Ac de las clases IgM e IgG de 22 y 31, respectivamente.

TABLA 3. Número y porcentaje de muestras de suero consideradas positivas acorde al nivel de Anticuerpos anti- *Naegleria fowleri* presentes.

GRUPO	GLOBULINA	M POSITIVAS	PORCENTAJE
ENFERMOS	IgA	20	80
	IgM	23	92
	IgG	9	36
DONADORES	IgA	14	13.7
	IgM	27	26.4
	IgG	0	0
REFERENCIA	IgA	3	4.6
	IgM	0	0
	IgG	3	4.6

En cuanto a los Ac presentes en suero, se observa también que los mayores porcentajes de muestras positivas se encontraron en el grupo de enfermos, con valores cercanos al 90%. Así, tanto en este grupo como en el de donadores el mayor porcentaje de positivos fue para Ac de la clase IgM, seguidos por los de la clase IgA (tabla 3).

Es importante recordar que en el grupo denominado de enfermos no se presentaron casos de MEAP. Del total de las muestras el 48% correspondió a casos de rinitis; el 20% a bronconeumonía; el 12% a tuberculosis, y el 20% restante sin diagnóstico clínico determinado.

La comparación de los niveles de Ac anti-*N. fowleri* (dado en densidad óptica), en cada clase de globulina, entre los tres grupos y para ambas muestras se reportan en las figuras 1 a 3:

En la figura 1 se presentan los niveles de IgA anti-*N. fowleri* en las diferentes muestras procesadas. Se observa que en el grupo de enfermos el 80% de las muestras séricas fueron positivas con valores entre 0.400 y 1.574 de abs; en los grupos de donadores y de referencia las muestras positivas no excedieron el 15%. En cuanto a los Ac secretorios también fue en el grupo de enfermos donde se dio el mayor porcentaje de muestras positivas (60%), con valores desde 0.778 hasta 1.37 de abs.

Es importante enfatizar que los valores más altos en ambas muestras provienen de la misma persona (muestra P24), y en la muestra de saliva la lectura excedió el límite de 2.5.

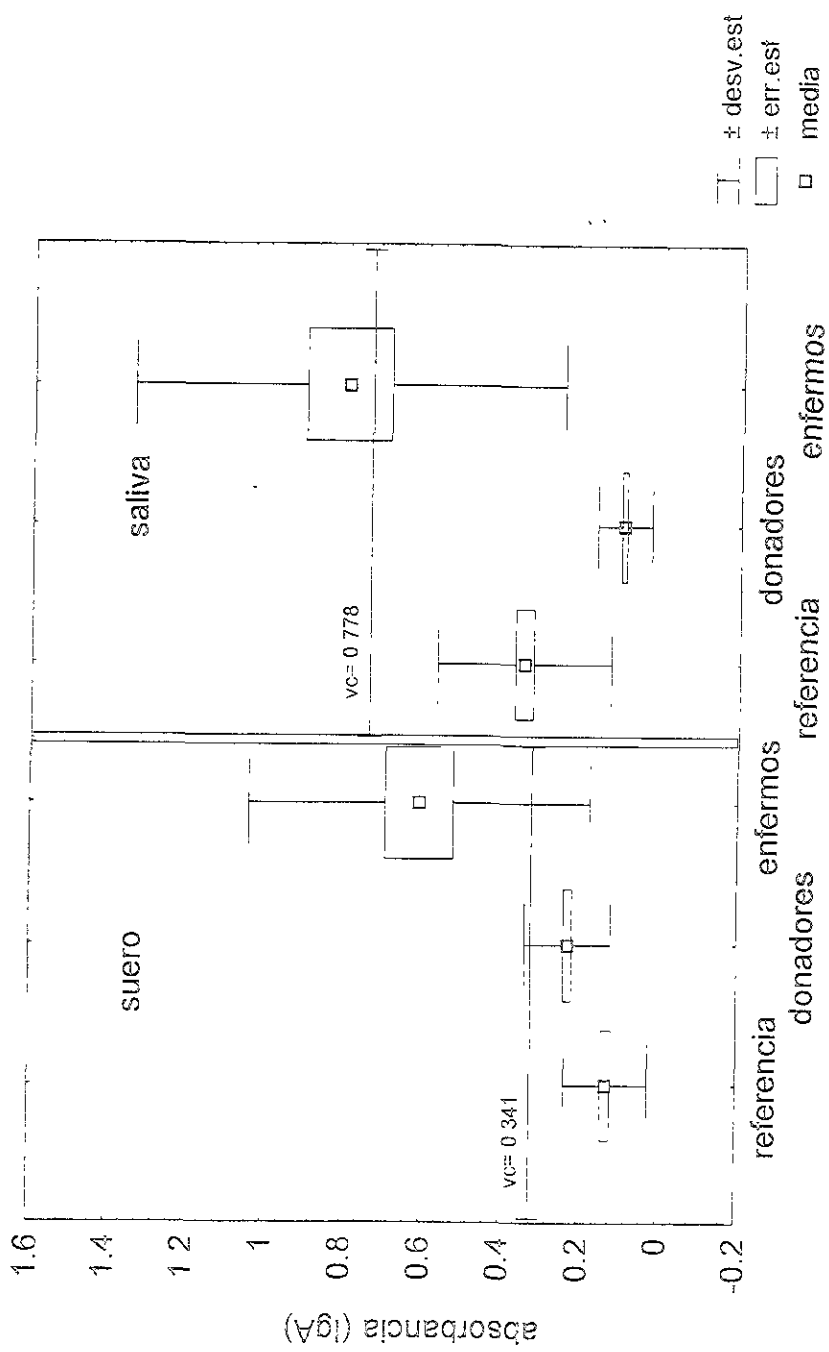


Fig. 1 - Anticuerpos IgA anti-*Naegleria fowleri* en suero y saliva de los tres grupos de estudio. Los resultados se muestran en forma de la media, error estándar y desviación estándar. Las personas del grupo de enfermos (enfermedades respiratorias) tuvieron en ambas muestras, valores de absorbancia mayores en comparación con los sujetos sanos del área endémica y los sujetos del grupo de referencia.

En la figura 2 se comparan los niveles de IgM registrados en los diferentes grupos. Se observa que el 92% de las muestras de suero del grupo de enfermos superó el valor de corte, con valores entre 0.712 y 1.5 de abs. En el grupo de donadores también se registraron valores por encima de 1.1 de abs, aunque solamente el 26% de las muestras fueron positivas.

De manera general en las muestras de saliva los registros fueron bajos. Así el porcentaje más alto de muestras que excedieron el valor de corte de 0.443 se presentó en el grupo de donadores con tan solo 22%; grupo en el que además la muestra D6 excedió también el límite de 2.5

En la figura 3 se observa que para los Ac de la clase IgG el 36% de las muestras de suero del grupo de enfermos excedieron el valor de corte de 1.66, con un valor máximo para dos de las muestras por encima del límite programado de 2.5 de abs (P7 y P19). En las muestras de saliva del grupo de donadores el 31% fueron positivas, con valores entre 0.381 y 0.902 de abs.

Como se indicó en la metodología esta clase de globulina no fue valorada en las muestras de saliva del grupo de enfermos debido a la cantidad limitada de las mismas.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos por la técnica de ELISA se procesaron a través de un análisis de varianza realizado entre los niveles de Ac encontrados en los diferentes grupos de estudio, para cada clase de inmunoglobulina (tabla 4).

Se muestra que hay una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de Ac presentes en los tres grupos de estudio (referencia, donadores y enfermos).

TABLA 4. Análisis de varianza entre los grupos de estudio para las tres globulinas valoradas.

Clase de globulina.	Valor de F	Nivel de p
IgA	64.93	p < 0.001
IgM	96.47	p < 0.001
IgG	211.53	p < 0.001

* Efecto significativo para $p < \alpha = 0.05$.

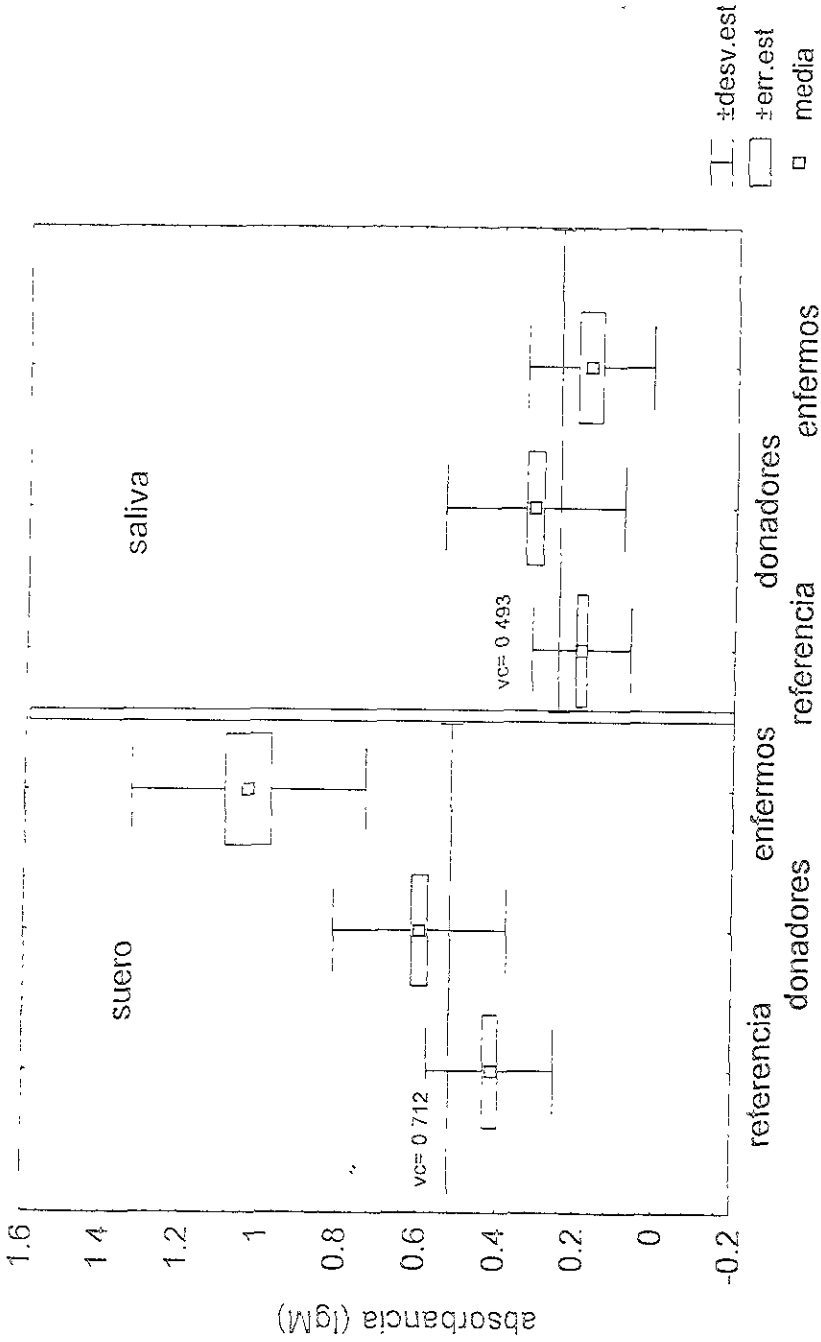


Fig. 2.- Anticuerpos IgM anti-*Naegleria fowleri* en suero y saliva de los tres grupos de estudio. Los resultados se muestran en forma de la media, error estándar y desviación estándar. En suero las personas del grupo de enfermos muestran los valores más altos, y en saliva las muestras del grupo de donadores (sanos del área endémica). En saliva el valor de corte fue menor con respecto al de suero.

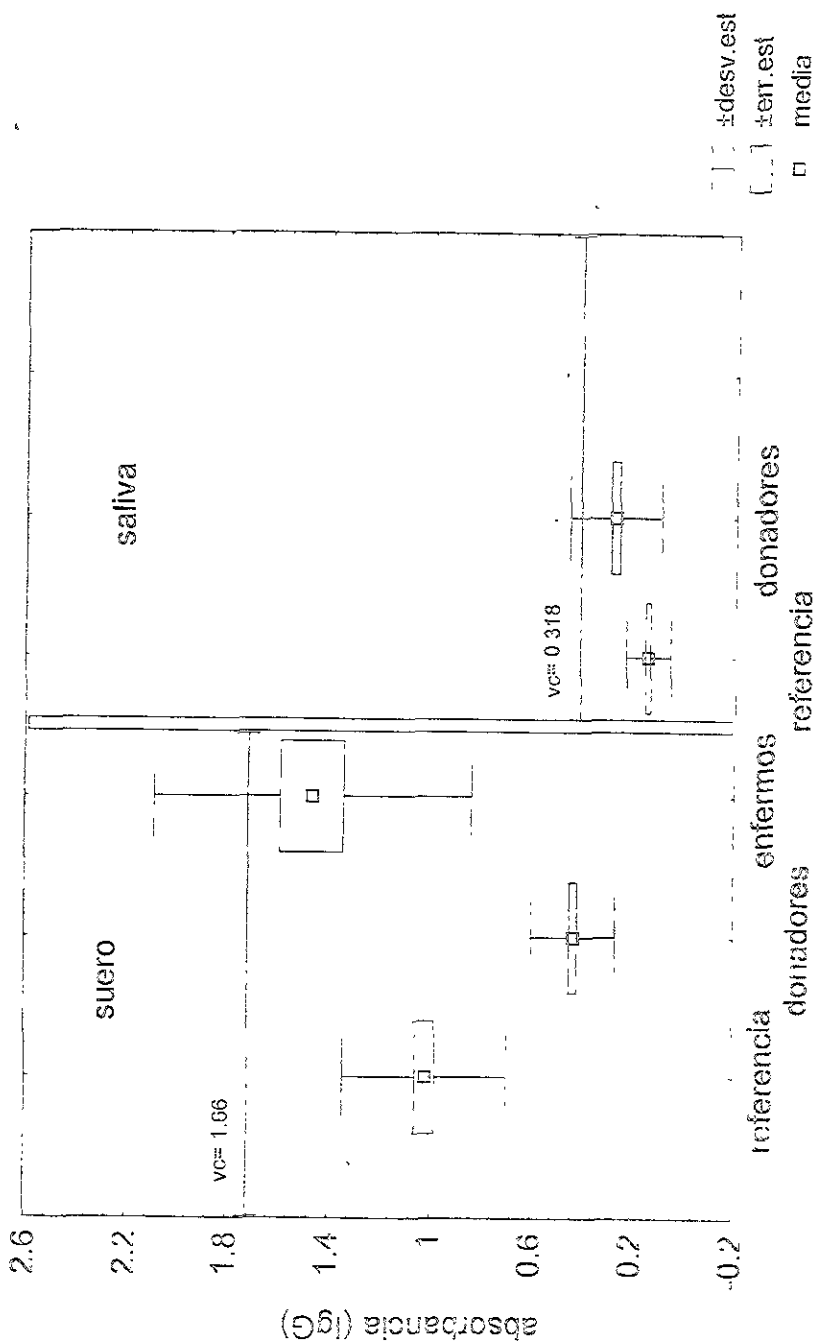


Fig.3 - Anticuerpos IgG anti-*Naegleria fowleri* en suero y saliva de los tres grupos de estudio. Los resultados se muestran en forma de la media, error estandar y desviación estandar. Solamente la tercera parte de las muestras de suero de enfermos y de saliva del grupo de donadores excedieron los valores de corte correspondientes. Las muestras de saliva del grupo de enfermos no fueron procesadas para esta globulina.

La prueba de Fisher de comparación múltiple de medias corroboró los resultados obtenidos por el análisis de varianza debido a que casi todas las comparaciones resultaron estadísticamente diferentes, excepto entre los niveles de IgA en el suero del grupo de referencia y las muestras de saliva del grupo de donadores; y entre los niveles de IgM en las muestras de saliva del grupo de referencia y de enfermos (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba de Fisher de comparación múltiple de medias entre los valores obtenidos para cada globulina, en cada grupo de estudio y para cada muestra obtenida.

GLOBULINA	MUESTRA	No DE MUES- TRAS (n)	MEDIA X	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
IgA	R-SU	65	0.129 a	0.106
	D-SU	100	0.229 b	0.109
	E-SU	25	0.606 c	0.431
	R-SA	82	0.347 d	0.219
	D-SA	100	0.095 a	0.069
	E-SA	25	0.797 e	0.543
IgM	R-SU	65	0.412 a	0.160
	D-SU	100	0.593 b	0.216
	E-SU	25	1.029 c	0.296
	R-SA	80	0.190 d	0.125
	D-SA	100	0.313 e	0.229
	E-SA	25	0.174 d	0.159
IgG	R-SU	65	1.020 a	0.321
	D-SU	100	0.432 b	0.165
	E-SU	25	1.463 c	0.624
	R-SA	65	0.144 d	0.087
	D-SA	100	0.276 e	0.181
	E-SA	0	0.0	0.0

* NOTA. Muestras del grupo de referencia (R): de donadores (D) y de enfermos (E); suero (SU), saliva (SA). Cuando la letra adjunta a los valores de la media es diferente indica que estadísticamente son diferentes con una $p < 0.001$

De manera adicional se calculó el coeficiente de correlación entre los niveles de Ac anti-*N. fowleri* y anti-*E. histolytica* obtenidos por la técnica de ELISA para las muestras del grupo de referencia. Los resultados se reportan en la tabla 6; solamente se presenta una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de IgG en las muestras de suero.

Tabla 6. Comparación de los niveles de Anticuerpos para *N. fowleri* y *E. histolytica* en el grupo de referencia. Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

MUESTRA	GLOBULINA	n	r	p
SUERO	IgA	62	0.137	0.286
	IgM	59	0.100	0.449
	IgG	60	0.440	0.0004
SALIVA	IgA	68	0.170	0.164
	IgM	69	0.130	0.277

4.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE *Naegleria fowleri* POR LA TÉCNICA DE INMUNOBLOTS.

Los perfiles proteicos electroforéticos de las cepas en estudio obtenidos en la primera fase de la técnica de inmunoblots se presentan en la figura 4; se muestra la semejanza en peso molecular de algunas de las proteínas de *N. fowleri* y *E. histolytica*.

El número de muestras de suero y saliva que se utilizaron en el reconocimiento de proteínas específicas a partir del extracto de *N. fowleri* corresponden al indicado en la tabla 2.

Los porcentajes que se muestran en las tablas 7 a 9 se calcularon considerando únicamente las muestras en las que reveló alguna proteína; enlistándose además, sólo las proteínas que fueron reconocidas de manera frecuente en cada grupo de muestras evaluadas.

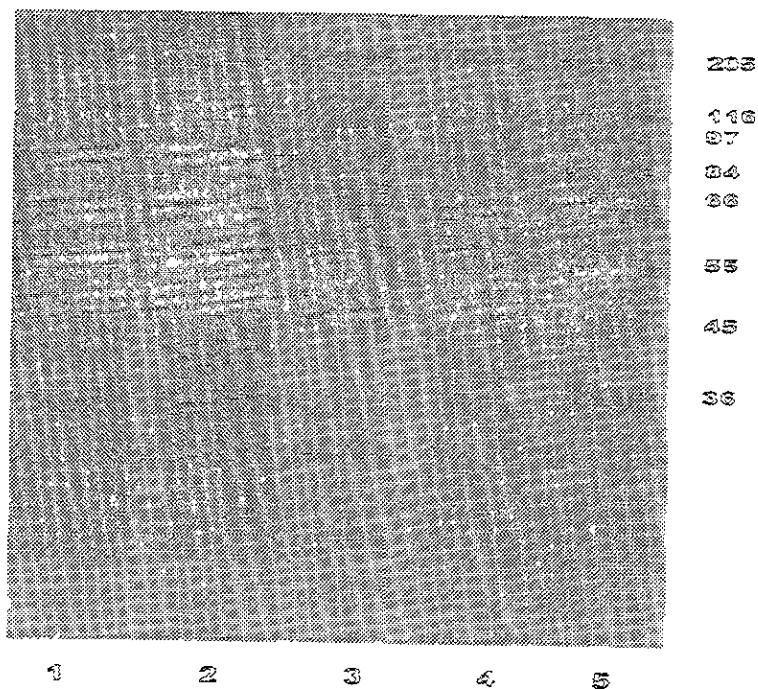


Fig.4 - Perfiles proteicos electroforéticos de las cepas en estudio: carriles 1-2 *E. Histolytica*; 3-4 *N. fowleri* y 5 Marcador de peso molecular de alto rango (kDa). Se presentan semejanzas en el peso molecular entre proteínas de ambas especies.

Los resultados que se describen a continuación son referidos en la tabla 7.

En el grupo de enfermos las proteínas que se detectaron de manera más frecuente fueron las de 46 y 62 kDa por la IgA sérica (fig 5); y las de 62 y 107 kDa por la secretoria (fig 6); cada una con frecuencias de 70, 60, 54 y 54 por ciento, respectivamente. Con respecto a los Ac séricos de las clases IgM (fig 7) e IgG (fig 8) las moléculas que fueron reconocidas por más del 50% de las muestras procesadas son de 57, 67; 46 y 75 kDa, respectivamente. Los Ac secretorios correspondientes no revelaron ninguna proteína en el primero mientras que en el segundo no fueron evaluados, como se mencionó previamente.

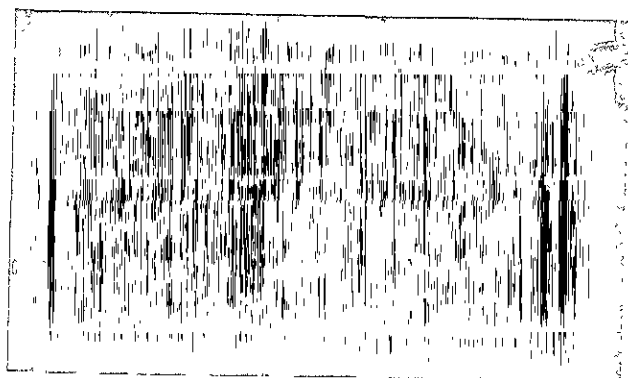
En el grupo de donadores las proteínas que se reconocieron con mayor frecuencia por Ac de la clase IgA en suero y saliva fueron de aproximadamente 42 y 50 kDa, con frecuencias de 43% y 58%, respectivamente (figs. 5 y 6). En cuanto a los Ac séricos de la clase IgM las proteínas que se detectaron con mayor frecuencia fueron de 57, 75 y 157 kDa, de éstas las de 57 y 75, con frecuencias de 91% y 68%, muestran un patrón muy claro lo que las señala como moléculas de particular importancia (fig 7). Con respecto a los Ac séricos y secretorios de la clase IgG también revelaron una proteína de 57 kDa, además de las moléculas de 36, 46 y 67 kDa; todas ellas con frecuencias por arriba del 50% (fig 8).

En el grupo de referencia el número de muestras utilizadas fue muy bajo, debido a que éstas en su mayoría fueron consideradas negativas, no obstante se dio el reconocimiento de una proteína de aproximadamente 90 kDa en las cuatro muestras valoradas de suero por Ac de la clase IgA (fig. 5).

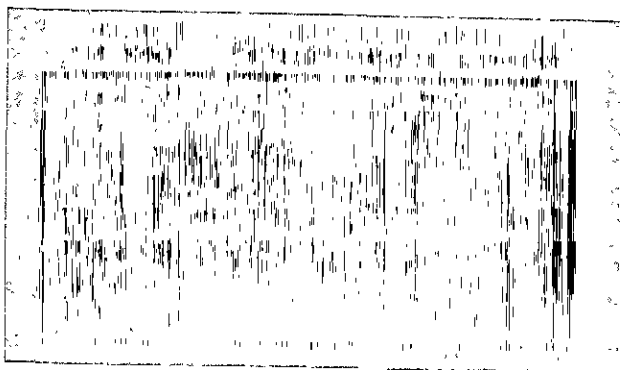
TABLA 7: Proteínas de *N. fowleri* con mayor frecuencia de reconocimiento por los Anticuerpos específicos.

CLASE DE GLOBULINA DETECTADA	PROTEÍNA RECONOCIDA P M (kDa)	GPO. ENFERMOS		GPO. DONADORES		GPO REFERENCIA	
		SUERO	SALIVA	SUERO	SALIVA	SUERO	SALIVA
IgA	171	10	45	0	0	0	0
	107	0	54	7	0	25	0
	102	10	18	14	33	0	0
	90	0	0	21	16	100	0
	62	60	54	0	16	0	50
	50	20	27	35	58	0	0
	46	70	0	14	16	0	0
	42	10	18	43	0	0	0
	10	20	18	21	50	0	0
IgM	215	0	0	0	0	0	0
	157	0	0	65	11	0	0
	75	23	0	68	0	0	0
	67	66	0	24	11	0	0
	57	58	0	91	0	0	0
IgG	88	22	-	26	28	66	0
	75	55	-	40	10	0	0
	67	10	-	60	28	0	0
	57	22	-	73	47	0	0
	46	66	-	60	28	0	0
	36	11	-	66	28	66	0
	10	33	-	53	5	0	0

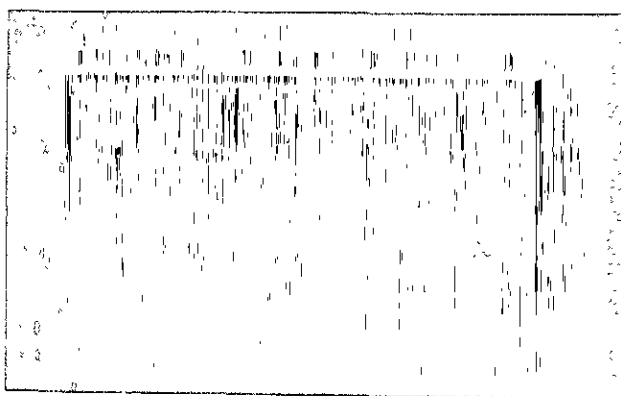
* Los resultados indican el porcentaje de las muestras utilizadas que reconocieron a cada una de las proteínas señaladas.



1

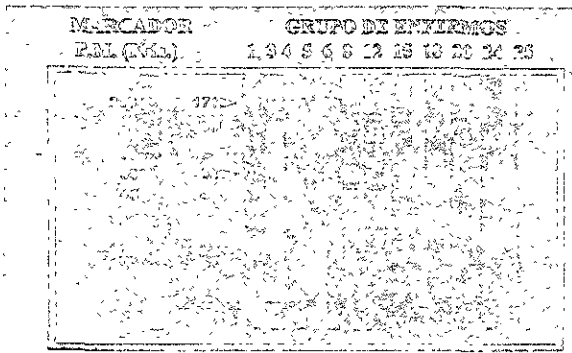


2

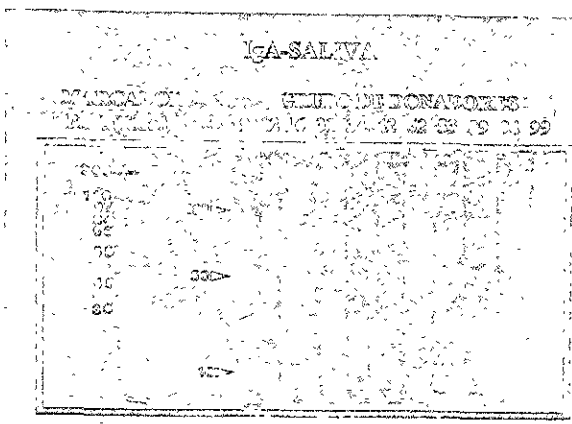


3

Figura 5. Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de *N. fowleri* en muestras de suero de los tres grupos de estudio. Las proteínas inmunoreactivas fueron diferentes en los tres grupos. Las mas frecuentes fueron de: 1) 62 y 46 kDa reconocidas por 60 y 70 % de las muestras de suero de enfermos. 2) La de 42 kDa (43 %) lo fue en el grupo de donadores, 3) y la de 90 kda en el grupo de referencia. Las cuatro muestras de la extrema derecha corresponden a las de saliva del mismo grupo en las que una proteína de 62 kDa fue reactiva en dos de las cuatro muestras procesadas.



1



2

Figura 6 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de *N. meningitidis* en muestras de saliva de los grupos de donadores y enfermos. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes fueron de 1) 62 y 107 kDa en las muestras del grupo de enfermos, 2) y las de 105 y 102 kDa en el grupo de donadores. Las muestras correspondientes al grupo de referencia están incluidas en la figura 1-3.

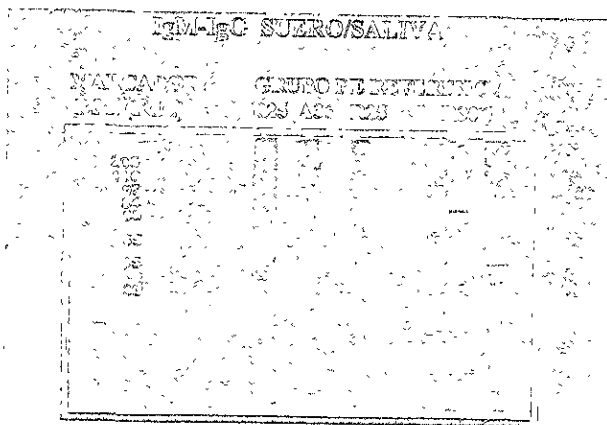
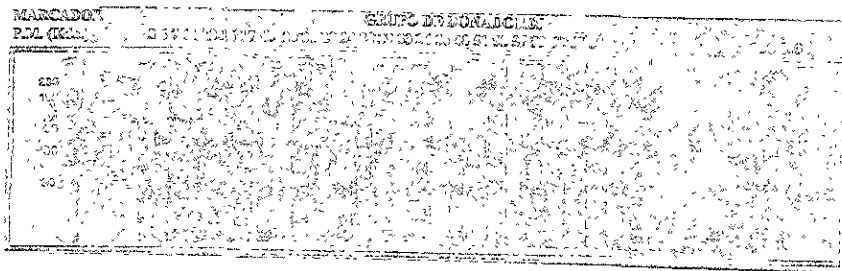
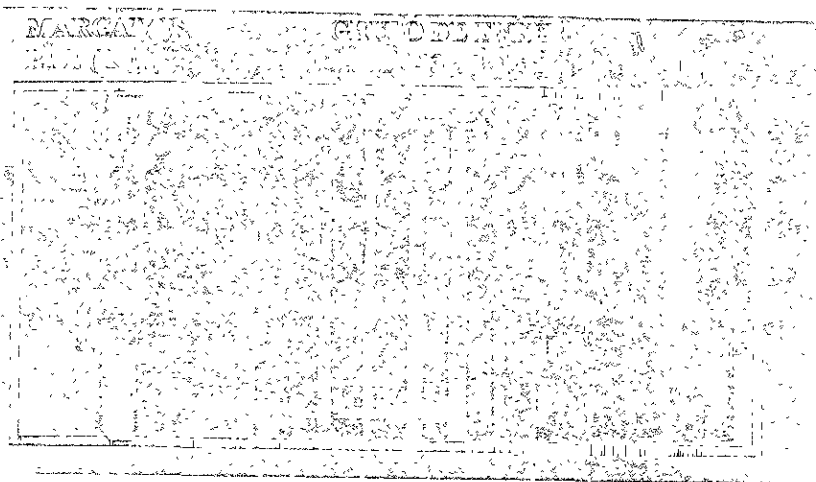


Figura 7 Análisis de inmunoblots de Ac IgM contra antígenos de *N. fowleri* en muestras de suero de los tres grupos de estudio. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes fueron de 1) 57 y 67 kDa en las muestras del grupo de enfermos, 2) moléculas de 57, 75 y 157 kDa en el grupo de donadores, 3) En el grupo de referencia no se presentó repetitividad en las moléculas inmunoreactivas. De manera adicional se presentan dos muestras de saliva para IgG (R30 y B1)

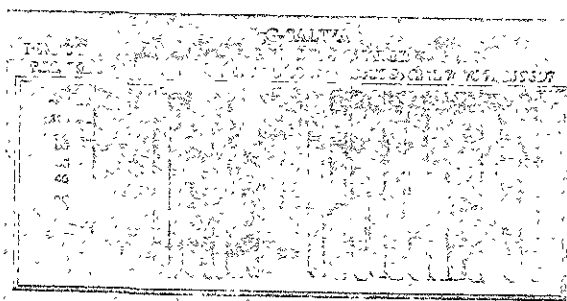
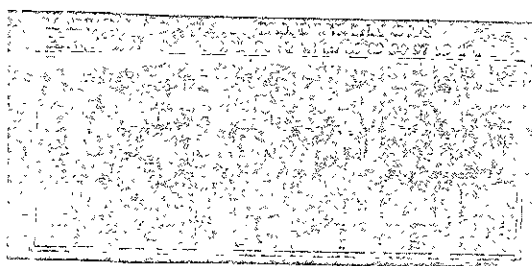
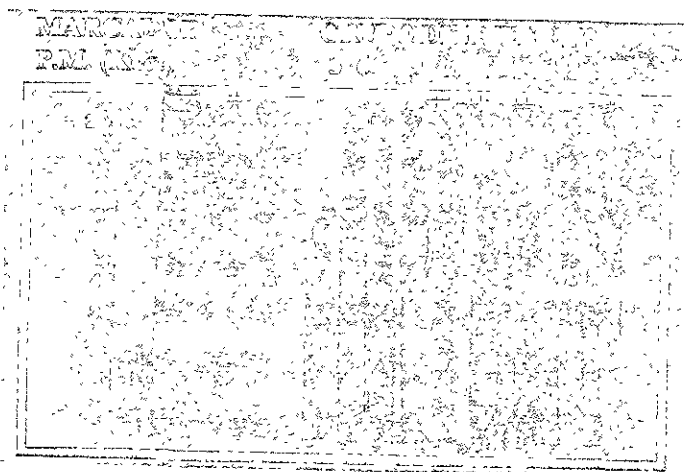


Figura 8 Análisis de inmunoblots de Ac IgG contra antígenos de *N. fowleri* en muestras de suero de los grupos de donadores y enfermos. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes fueron de 1) 46 y 75 kDa en las muestras del grupo de enfermos, 2) moléculas de 36, 46, 57 y 75 kDa en el grupo de donadores. Los correspondientes al grupo de referencia no fueron utilizados debido a que solamente revelaron dos bandas muy tenues en dos de las tres muestras procesadas. 3) De manera adicional se presentaron las proteínas inmunoreactivas para los anticuerpos IgG presentes en las muestras de suero de grupo de donadores. Solamente una molécula entre 57 y 60 kDa se observa con mayor claridad.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE *Entamoeba histolytica* POR LA TÉCNICA DE INMUNOBLOTS

Las proteínas de *E. histolytica* reconocidas con mayor frecuencia por inmunoblots, utilizando las muestras de suero y saliva previamente seleccionadas, se reportan en la tabla 8. En el grupo de enfermos encontramos que los Ac IgA presentes en suero (fig 9) y saliva (fig 10) reconocen una proteína de 46 kDa, además de una de 30, 70 y 105 en el primero y una de 175 y 124 en la segunda. Para los Ac séricos de las clases IgM (fig 11) e IgG (fig 13) las proteínas identificadas fueron de 46 y 95 en ambos, y de 57 kDa, en el segundo. Los Ac secretorios correspondientes no revelaron ninguna proteína en el primero mientras que en el segundo no fueron evaluados, como se mencionó previamente.

Para el grupo de donadores las proteínas relevantes son de 57, 82, 105, 82 y 95 kDa para Ac IgA en suero (fig 9) y saliva (fig 10), respectivamente. Moléculas de 46 y 105 kDa para Ac IgM séricos (fig 11), y proteínas de 46, 80 y 88 kDa, entre otras, para Ac séricos IgG (fig 13). Con respecto a los Ac secretorios correspondientes tenemos que para la IgM todas las muestras valoradas fueron negativas; mientras que para los de la clase IgG además de que revelaron muy débilmente algunas proteínas no se encontró frecuencia alguna en su reconocimiento.

Para el grupo de referencia las proteínas inmunoreactivas son de 57, 75 y 82 kDa en suero (fig 9) y saliva (fig 10) por Ac IgA; una proteína de 46 kDa en ambas muestras por Ac IgM (fig 11 y 12) y proteínas de 175 y 194 kDa por Ac IgG séricos (fig 13).

TABLA 8: Proteínas de *Entamoeba histolytica* más frecuentemente reconocidas por los Anticuerpos específicos.

CLASE DE GLOBULINA DETECTADA	PROTEINA RECONOCIDA P.M. (kDa)	GPO ENFERMOS		GPO DONADORES		GPO. REFERENCIA	
		SUERO	SALIVA	SUERO	SALIVA	SUERO	SALIVA
IgA	173	0	63	33	0	50	25
	144	22	0	13	0	0	75
	124	33	50	20	10	0	0
	105	77	13	73	40	25	50
	95	44	13	13	50	0	25
	91	33	0	40	30	37	0
	82	22	25	60	80	37	100
	75	33	0	26	0	25	100
	70	66	38	40	0	37	25
	67	55	25	53	40	12	25
	60	22	25	40	0	0	0
	57	44	25	60	20	62	0
	46	66	50	26	40	12	25
	30	88	25	20	10	12	25
17	0	0	50	0	0	0	
IgM	105	0	-	81	0	33	0
	95	92	-	4	0	22	0
	90	0	-	45	0	22	25
	87	0	-	9	0	42	0
	46	92	-	95	0	77	83
IgG	194	0	-	0	0	88	-
	175	0	-	15	0	77	-
	150	0	-	53	0	-	-
	120	10	-	46	0	0	-
	112	0	-	53	0	77	-
	105	40	-	38	25	55	-
	95	60	-	55	0	33	-
	88	0	-	84	25	-	-
	80	40	-	61	0	-	-
	70	20	-	53	0	33	-
	63	30	-	61	0	33	-
	57	50	-	61	25	0	-
	46	60	-	46	25	33	-
	35	40	-	53	25	77	-
	25	30	-	61	0	77	-

* Los resultados indican el porcentaje de las muestras utilizadas que reconocieron a cada una de las proteínas señaladas

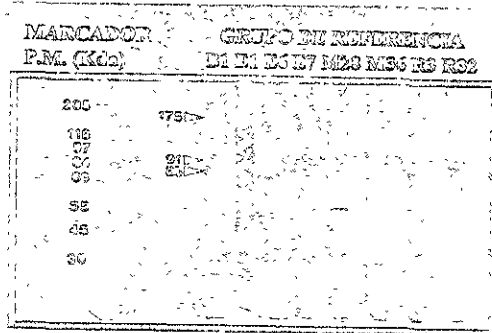
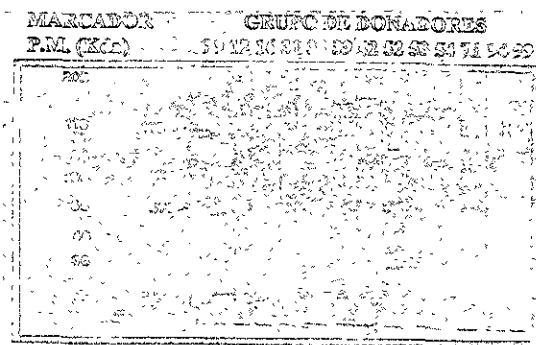
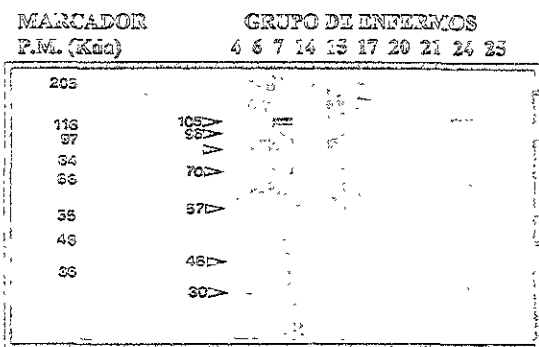
Finalmente encontramos que de manera general las proteínas inmunoreactivas de *N. fowleri* reconocidas por los Ac séricos y secretorios son diferentes. Así podemos comparar en la tabla 7 la variación presente entre las frecuencias para una misma molécula en ambos fluidos; exceptuando por ejemplo en el grupo de enfermos las frecuencias de IgA anti *N. fowleri* en suero y saliva para una molécula de 62 kDa (60 y 54 %, respectivamente). En el caso de *Entamoeba histolytica* la inmunoreactividad entre las muestras es semejante en un mayor número de moléculas (tabla 8). La comparación de las proteínas semejantes en peso molecular que fueron reconocidas en ambos microorganismos se presentan en la tabla 9; los Ac de la clase IgM no reconocieron péptidos de peso molecular semejante

TABLA 9. Comparación de las proteínas reconocidas de *Naegleria fowleri* y *Entamoeba histolytica* por los anticuerpos en estudio.

CLASE DE GLOBULINA DETECTADA	PROTEÍNA RECONOCIDA P.M. (kDa) *	GPO ENFERMOS		GPO DONADORES		GPO REFERENCIA	
		SUERO	SALIVA	SUERO	SALIVA	SUERO	SALIVA
IgA	171/173	10/0	45/63	0/33	0/0	0/50	0/25
	107/105	0/77	54/13	7/73	0/40	25/25	0/50
	90/91	0/33	0/0	21/40	16/30	100/37	0/0
	62/60	60/22	54/25	0/40	16/0	0/0	50/0
	46/46	70/66	0/50	14/26	16/40	0/12	0/25
IgG	88/88	22/0	-/-	26/84	28/25	66/0	0/-
	67/63	10/30	-/-	60/61	28/0	0/33	0/-
	57/57	22/50	-/-	73/61	47/25	0/0	0/-
	46/46	66/60	-/-	60/46	28/25	0/33	0/-
	36/35	11/40	-/-	66/53	28/25	66/11	0/-

*P.M. correspondiente a la proteína de *N. fowleri*/*E. histolytica*

Los resultados indican el porcentaje de las muestras utilizadas que reconocieron a cada una de las proteínas señaladas. En las muestras de saliva del grupo de enfermos y del grupo de referencia no se evaluó el reconocimiento por IgG



10

10

Figura 9 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de *Elmormo* en muestras de suero de los tres grupos de estudio. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes se muestran en los gráficos: 1) grupo de enfermos; 2) grupo de donadores; 3) grupo de referencia.

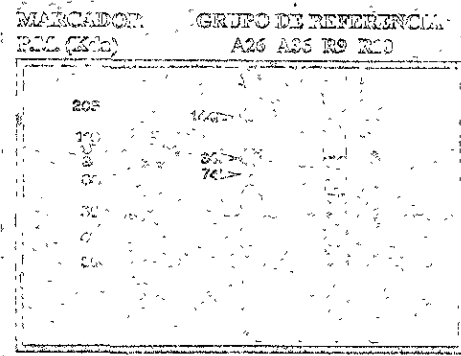
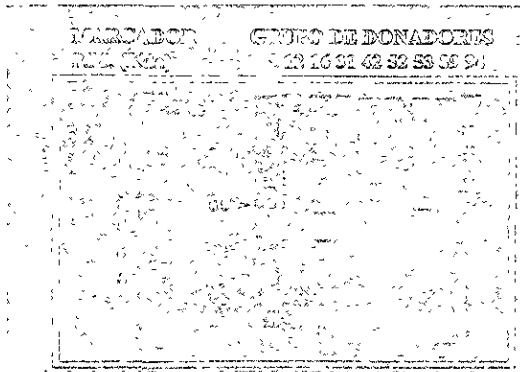
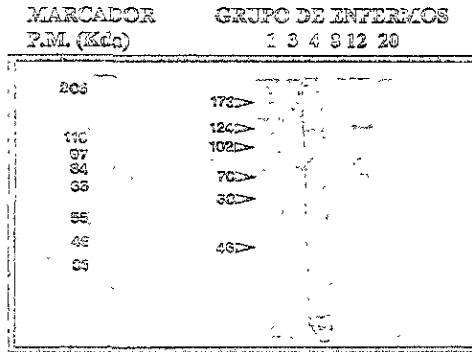


Figura 10 Análisis de inmunoblots de Ac IgA contra antígenos de *E.histolytica* en muestras de saliva de los tres grupos de estudio. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes se muestran en los gráficos: 1) grupo de enfermos, 2) grupo de donadores y 3) grupo de referencia.

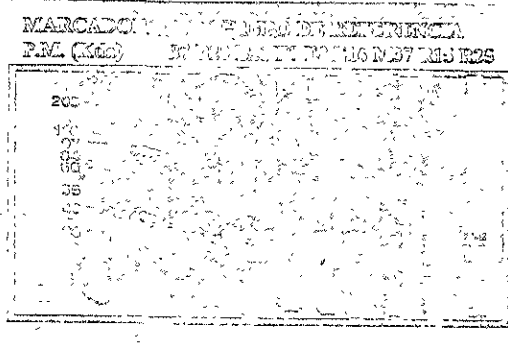
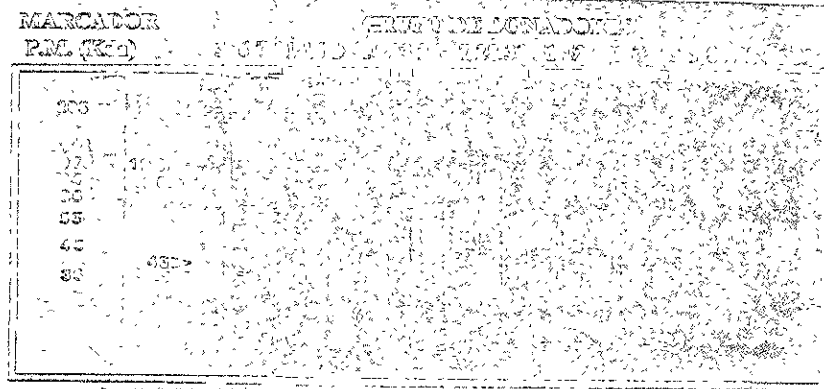
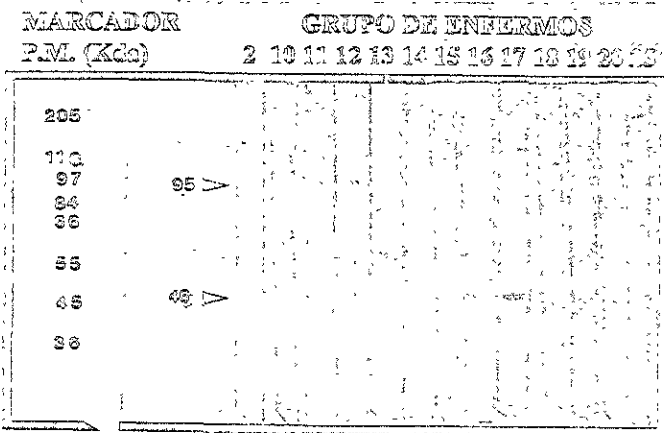


Figura 1. Análisis de inmunoblots de Ac IgM contra antígenos de *Elisshayna* en muestras de suero de los tres grupos de estudio. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes se muestran en los gráficos: 1) grupo de enfermos; 2) grupo de donadores; 3) grupo de referencia.

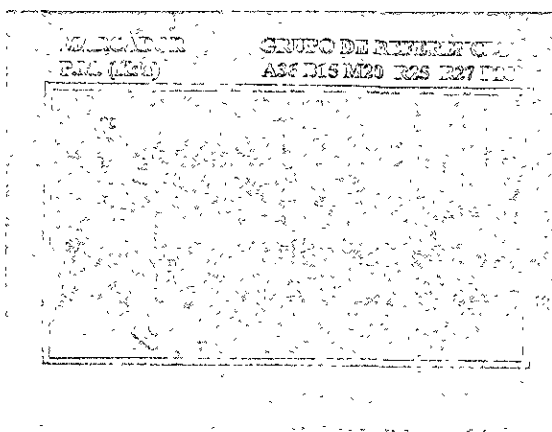
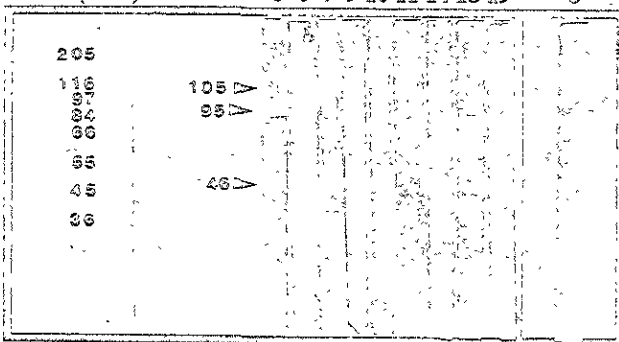


Figura 12 Análisis de inmunoblots de Ac IgM contra antígenos de *E. histolytica* en muestras de saliva del grupo de referencia. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes se muestran en el gráfico. El análisis realizado con las muestras del grupo de donadores fue negativo. Las correspondientes al grupo de enfermos no se realizaron debido a que el análisis con las proteínas de *N. fowleri* fue negativo, por tanto no tenía sentido realizarlo.

MARCADOR
P.M. (Kda)

GRUPO DE ENFERMOS

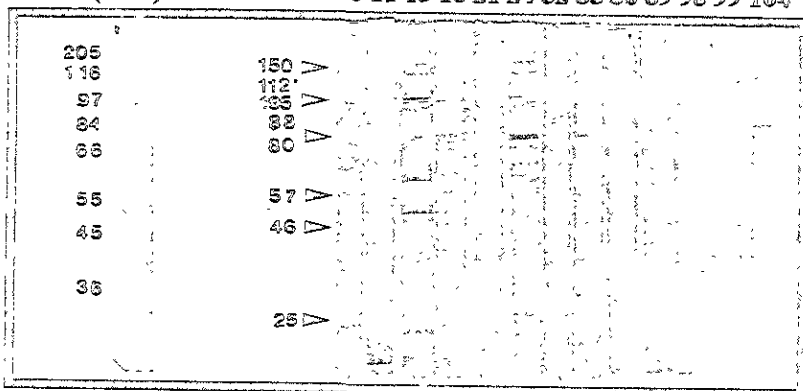
3 6 7 9 10 11 14 18 19 6



MARCADOR
P.M. (Kda)

GRUPO DE DONADORES

6 11 13 18 21 24 52 85 86 89 98 99 104



MARCADOR
P.M. (Kda)

GRUPO DE REFERENCIA

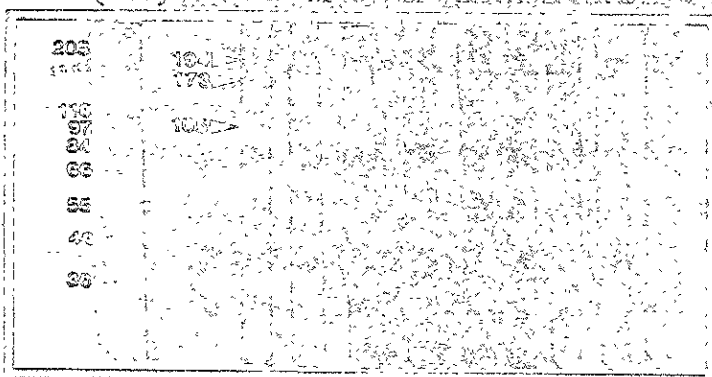


Figura 13 Análisis de inmunoblot de Ac IgG contra antígenos de *E. histolytica* en muestras de suero de los tres grupos de estudio. Las proteínas inmunoreactivas más frecuentes se muestran en los gráficos: 1) grupo de enfermos; 2) grupo de donadores; 3) grupo de referencia. Adicionalmente en 1) se presenta la única banda reactiva en suero (muestra 6).

5. DISCUSIÓN

5.1. PRESENCIA DE ANTICUERPOS anti- *N. fowleri* EN MUESTRAS DE SUERO Y SALIVA

Los resultados obtenidos confirman la presencia de Ac específicos para *N. fowleri* en poblaciones humanas a nivel sistémico, como se había reportado (Marciano-Cabral, y col., 1987; Dubray, y col., 1987), y demuestran que en la saliva humana existen Ac específicos para *N. fowleri*, principalmente IgA y en menor grado IgM e IgG.

Realizando una comparación global de la presencia de Ac anti *N. fowleri* se observó que estos se encuentran principalmente en las muestras obtenidas de los grupos ubicados en el área endémica (de donadores y enfermos) Mostrando también que en ambos los niveles de Ac difieren entre sí, y entre los niveles registrados en el grupo de referencia (tablas 4 y 5) Estos resultados apoyan la hipótesis inicialmente expuesta que refiere una mayor exposición de las personas que viven en la ciudad de San Luis Potosí y en Ciudad Valles a los antígenos de *N. fowleri*. Marciano-Cabral y colaboradores (1987) determinaron la actividad aglutinante a *N. fowleri* en muestras de suero de adultos de dos poblaciones diferentes, Pennsylvania y Carolina del Norte, encontrando en promedio una mayor aglutinación en las personas de la segunda ciudad. Una interpretación de las diferencias en la actividad aglutinante en las dos poblaciones indica que las muestras de la población de Pennsylvania han sido expuestas menos extensivamente a los antígenos de *N. fowleri* que las de Carolina del Norte. La variación en la exposición puede reflejar la diferente distribución en el ambiente de *N. fowleri*, o diferencias en el contacto entre los humanos y los reservorios del antígeno *N. fowleri* ha sido aislada de cuerpos de agua naturales y de recreo en Ciudad Valles y San Luis Potosí donde la gente desarrolla frecuentemente actividades acuáticas motivados por las condiciones climáticas locales (Ortiz, 1993). Sadaka y col en 1994 encontraron *N. gruberi* y *A. rhysodes* en las fosas nasales de seis niños saludables que vivían cerca de canales de los cuales se aislaron amibas de vida libre.

5.1.1. ANTICUERPOS IgA anti *N. fowleri*

De manera general en el grupo de enfermos se registró el mayor número de muestras consideradas positivas los niveles de Ac IgA fueron considerablemente mayores a los evaluados en los grupos restantes (Figura 1). En el suero el 80% de las muestras presentaron niveles de Ac IgA que excedieron el valor de corte.

mientras que en la secreción solo el 60% lo fue, debido quizá a que el valor de corte fue mayor; sin embargo es en la secreción en las que se registraron los niveles mayores. Estos resultados sugieren que los individuos, a través de la mucosa nasal, tuvieron contacto con antígenos de *N. fowleri*, lo que generó una mayor producción de Ac a ese nivel, que es la vía de entrada reportada para estas amibas (Martínez, 1985). Posiblemente las amibas penetran la mucosa y sus antígenos son procesados y presentados por células especializadas activando una respuesta vía sistémica en la que se generan básicamente Ac IgM e IgG elevándose así sus niveles en sangre como se registró para estas clases de Ac (figuras 2 y 3). Ryu e Im (1992) encontraron que Ac monoclonales isotipo IgA especie específicos reconocen determinantes antigénicos localizados en la superficie del trofozoito de *N. fowleri*. Estos Ac tienen la capacidad de aglutinar trofozoitos e inhibir su crecimiento en medio de cultivo. Los Ac obtenidos de la clona NF2, isotipo IgA, inhiben la proliferación de trofozoitos *in vitro*, reducen la citotoxicidad de la amiba contra células CHO y reducen la virulencia de la amiba.

En los grupos restantes los niveles de IgA en ambas muestras fueron considerablemente menores lo cual podría considerarse como un indicio de escaso o nulo contacto de estas personas con antígenos de *N. fowleri* (figura 1), sin embargo niveles elevados de IgM e IgG en algunas de las muestras de estos grupos son contradictorios (figura 2 y 3). Así mientras en el grupo de donadores todas las muestras de saliva son consideradas negativas por sus niveles de IgA, aproximadamente un 25% de éstas son consideradas positivas por sus niveles de IgM sérica y secretoria.

Estos resultados muestran una respuesta heterogénea de los grupos del área endémica a un mismo agente etiológico que pudiera ser explicada por una activación de clones con marcadores de superficie diferentes entre personas sanas y enfermas, quizá relacionadas a la susceptibilidad y no a variabilidad antigénica entre cepas pues son varios los trabajos en los que se señala la homogeneidad antigénica de esta especie (Willaert y col., 1974; Willaert y col., 1977; Visvesvara y Healy, 1975; Visvesvara y col., 1987). Sin embargo bastante se ha escrito también sobre la diversidad estructural y antigénica de los parásitos patógenos, que aunados a los mecanismos de resistencia y evasión que poseen generan heterogeneidad de las respuestas inmunitarias específicas que provocan. Así, fenómenos de reducción o alteración de sus moléculas antigénicas, y la inhibición activa de la respuesta inmunitaria del hospedero pueden explicar la heterogeneidad de la respuesta a un mismo agente etiológico (Abbas y col., 1995).

5.2.2. ANTICUERPOS IgM anti *N. fowleri*

Los niveles de Ac IgM en las muestras de saliva y suero en los diferentes grupos fueron también variables (tablas 2 y 3); mientras en las muestras de suero del grupo de enfermos se registró el mayor porcentaje de muestras positivas (92%), en

las muestras de saliva solamente el 8% sobrepaso el nivel de corte. En el grupo de donadores se registraron mayores niveles de IgM en suero y saliva que los registrados para Ac IgA, en las muestras correspondientes. Estos resultados dan un indicio de la importancia que podrían desempeñar esta clase de Ac en la respuesta a infecciones por *N. fowleri*. En un estudio realizado por Sathar y col. (1990) se reporta la utilización de esta clase de Ac en el diagnóstico de absceso hepático amibiano (provocado por *E. histolytica*) dada su alta especificidad en la técnica de ELISA; y en el diagnóstico de giardiasis y toxoplasmosis. Marciano-Cabra y colaboradores (1987) encuentran Ac aglutinantes en muestras de suero de adultos en Carolina del Norte y Pennsylvania indicando que esta actividad aglutinante correlaciona con la capacidad de sus Ac IgM de unirse a extractos de *Naegleria* spp. Estos resultados aunados a los escasos niveles de IgG sérica en el grupo de donadores (figura 3) sugieren la activación de clones de linfocitos B en un primocontacte con antígenos de *N. fowleri*. Sin embargo, Dubray y colaboradores (1987) reportaron que como el nivel de Ac IgM declina rápidamente después de la exposición inicial a un antígeno, la presencia de Ac IgM en 61% de las 115 muestras procesadas sugiere una infección crónica o una exposición persistente a *Naegleria* spp. en estos individuos. Y menciona que la habilidad de *Naegleria* a formar un casquete e internalizar Ac unidos a su superficie como describieron Ferrante y col. en 1979, puede tener un efecto sobre la respuesta de IgM, como lo refirieron Cursons y col. en 1980.

5.1.3 ANTICUERPOS IgG anti *N. fowleri*.

La presencia de Ac IgG a nivel sérico presupone del contacto repetido de antígenos de *N. fowleri* a nivel sistémico. Sin embargo el porcentaje de muestras positivas correspondientes fue bajo (apenas del 36% en el grupo de enfermos) en comparación con las otras clases de globulinas valoradas.

Este resultado fue afectado por el valor de corte obtenido para esta clase de globulina, debido a que en el grupo de referencia los niveles de IgG fueron elevados (figura 3), por tanto el valor de corte de 1.66 de absorbancia restringió el número de muestras que se consideraron positivas, y despertó la duda sobre la generación de estos anticuerpos. Lo anterior, aunado a los antecedentes epidemiológicos de amibiasis por *E. histolytica* en México, llevó a comparar el grado de correlación existente entre los niveles de Ac específicos para ambas especies en las muestras del grupo de referencia, además de utilizar los antígenos de *E. histolytica* para los inmunoblots.

Los resultados de este análisis mostrados en la tabla 5 indican que de manera general no existe una correlación entre los niveles de Ac anti- *N. fowleri* y anti *E. histolytica*, excepto precisamente para los Ac séricos de la clase IgG, en los que a pesar de existir una $r = 0.44$ la validación estadística de $p = 0.004$ nos indica una posible correlación. Así, tomando en cuenta estos resultados trabajamos en el

análisis de inmunoblots con antígenos de *E. histolytica* (en la medida de lo posible considerando la cantidad de muestra existente). Gorospe y col. (1996) después de clonar y secuenciar un intrón del gen de la actina de *N. fowleri*, realizaron una reconstrucción filogenética utilizando su secuencia de aminoácidos en un método de distancia y ubicaron a *N. fowleri* más cerca de *Plasmodium* y *Entamoeba* que de *Acanthamoeba*.

Respecto a la misma globulina sérica en los grupos de donadores y enfermos, y como se mencionó anteriormente, la tendencia fue la misma, pocas o ninguna muestra positiva; probablemente por la misma razón (un valor de corte elevado). Sin embargo, considerando trabajos previos realizados a nivel sérico, debe existir algún otro factor que explique este resultado, debido a que en ellos se resalta la presencia o participación de la IgG anti- *N. fowleri*. Dubray y colaboradores (1987) reportaron la presencia de Ac séricos IgG en 101 de 115 muestras de suero evaluadas, con títulos promedio de 1:80. Además se ha reportado que sólo la transferencia de la fracción IgG confiere protección en ratones al reto con *N. fowleri* (Ferrante, A y Rowan-Kelly, B; 1988). De manera adicional Haggerty y John (1982) en un estudio realizado en ratones reportaron que después de una tercera inoculación intravenosa de *N. fowleri* el mayor incremento obtenido fue de IgG; mientras que los niveles de IgA e IgM se incrementaron y decrecieron rápidamente después de la inoculación. Indicando además que el aumento en los niveles de esta globulina están relacionados a los máximos niveles de aglutinación. Estos antecedentes se contraponen con el número de muestras consideradas positivas en este trabajo, sin embargo el criterio al calcular el valor de corte fue respetado. Considerando lo anterior es conveniente enfatizar lo importante que hubiera sido en el presente estudio contar con un grupo de enfermos específicos de MEAP que permitiera obtener un valor de corte en base a sus niveles de Ac específicos presentes.

La presencia de altos niveles de IgG en las muestras de saliva en el grupo de donadores deben estar asociados a personas con problemas de rinitis, o algún otro padecimiento que dañe la integridad de la mucosa permitiendo un exudado de IgG a este nivel, lo que provoca un proceso inflamatorio aún más grave. Hubiera sido muy interesante la comparación de estos resultados con los correspondientes al grupo de enfermos debido a que un buen número de ellos son pacientes con rinitis, sin embargo, la cantidad de muestra que se obtuvo de este grupo no permitió el análisis.

5.1.4. ANTICUERPOS anti- *N. fowleri* EN EL GRUPO DE ENFERMOS.

Importante es puntualizar en cuanto a los resultados obtenidos en el grupo referido como de enfermos, debido a que ninguna de las muestras pertenecen a enfermos específicos de MEAP. Sin embargo, como se muestra en las figuras 1-3 los niveles

de los Ac valorados son lo suficientemente altos para considerar a un buen número de estas muestras positivas.

Como se mencionó previamente, el mayor número de muestras pertenecen a pacientes con problemas de rinitis, seguidos en menor grado por pacientes con bronconeumonía y otros padecimientos del tracto respiratorio. Rivera y col. (1989) en México habían reportado ya aislamientos de amibas anfitoicas del género *Acanthamoeba* de exudados nasales de pacientes con rinitis; dejando entrever la importancia al respecto debido al potencial patógeno de estos microorganismos.

El presente trabajo no permite concluir la participación de los anticuerpos séricos y secretorios en la inmunidad a *N. fowleri*. Sin embargo su presencia en la población a nivel sistémico (como ya lo habían referido), y a nivel mucosal (aportación del presente trabajo); refuerza la hipótesis de Ferrante (1991) y otros investigadores que proponen que los anticuerpos participan en la inmunidad contra estos microorganismos opsonizándolos, promoviendo así una destrucción celular dependiente de Ac; aunado al mecanismo principal de activación de células fagocíticas, principalmente neutrófilos, por linfocinas.

5.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS POR LA TÉCNICA DE INMUNOBLOTS.

Los patrones de respuesta fueron muy diversos a nivel de grupo de estudio, por clase de globulina valorada y por tipo de muestra. Este resultado puede ser explicado por varias razones: 1) al contacto con cepas de *N. fowleri* antigénicamente diferentes; sin embargo ha sido reportada por varios grupos de trabajo la homogeneidad antigénica de la especie (Willaert y col., 1974; Willaert y col., 1977; Visvesvara y Healy, 1975, Visvesvara y col., 1987); 2) a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune. A pesar de que se apoya la homogeneidad antigénica de la especie, específicamente para *N. fowleri* se han descrito dos mecanismos que podrían estar implicados en la evasión al sistema inmune y por tanto en la heterogeneidad de la respuesta a su infección: la movilización de los Ac unidos a su superficie para formar un casquete e internalizarlos posteriormente (Ferrante y Thong, 1979), y la resistencia a la lisis por complemento, asociada a glicoproteínas presentes en la superficie de cepas patógenas de alta virulencia (Toney y Marciano-Cabral, 1992), así como a la formación de vesículas en la membrana para remover las proteínas del complemento depositadas en ella (Toney y Marciano-Cabral, 1994). Se ha reportado también la inmunización de animales de laboratorio con una fracción del sobrenadante de un cultivo de *N. fowleri* del que se obtuvo el 100% de protección (Thong y col., 1980). Ellos habían establecido en 1979 que el antígeno del sobrenadante del medio de cultivo es un componente de superficie de la membrana plasmática de la amiba (Ferrante, 1991); lo anterior podría estar asociado al mecanismo de expulsión de antígenos y por tanto también en la heterogeneidad de

la respuesta encontrada; 3) a la exposición de las personas a las diferentes especies del género *Naegleria* que comparten determinantes antigénicos que generan reacciones cruzadas. Marciano-Cabral y col. (1987) observaron una disminución en la capacidad aglutinante a *N. fowleri* de cuatro muestras de suero adsorbidas con antígenos de *N. lovaniensis*; y establecen que ambas especies comparten antígenos de superficie. Dubray y col. (1987) reportaron también la gran similitud entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* en los resultados serológicos con las pruebas de inmunoperoxidasa y Western blot, sugiriendo además que los Ac reconocen en ambas sitios antigénicos idénticos. Sin embargo, *N. lovaniensis* fue originalmente considerada como una variante no patógena de *N. fowleri*. Actualmente se diferencian por isoelectroenfoque usando aspartato aminotransferasa (Kilvington y col., 1984). Sugiriendo además, la posibilidad de una protección contra *N. fowleri* a través del contacto con *N. lovaniensis*. Habiéndose propuesto algo similar en relación a *N. gruberi*; demostrándose esta idea al inmunizar ratones con *N. gruberi* y ser protegidos contra *N. fowleri* por reto I.N (John y col., 1977); 4) al contacto o infección con otros microorganismos relacionados antigénicamente con *N. fowleri* lo que provocaría el reconocimiento a antígenos de *N. fowleri* por reacciones cruzadas. En México *E. histolytica* es la especie amibiana más importante debido a su "alta prevalencia en la población". Por tanto es considerada una de las principales especies que podrían estar involucradas en este reconocimiento cruzado. Por tanto, y como se mencionó anteriormente se calculó el coeficiente de correlación entre los niveles de Ac anti *N. fowleri*, anti- *E. histolytica* y anti- *A. polyphaga* (otra especie amibiana anáfitoica), en las muestras del grupo de referencia, resultando solamente una posible relación entre los Ac séricos de la clase IgG para las dos primeras especies mencionadas. En estudios previos realizados se reporta la no relación antigénica entre *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. (Visvesvara y col., 1987; Flores y col., 1990) y *E. histolytica* (Willaert y col. en 1973; Visvesvara y Healy en 1975). Sin embargo, en el análisis realizado en el presente estudio se presentan reconocimientos proteicos de *N. fowleri* y *E. histolytica* con pesos moleculares semejantes (tabla 9) lo que podríamos especular como relaciones antigénicas entre ambas (el peso molecular de estas proteínas se puntualizará más adelante), y 5) podrían estar incluso en función de diferencias genéticas entre los individuos, que se manifiestan como respuestas individuales distintas.

5.2.1. ANTICUERPOS IgA.

De las salivas y sueros de los tres grupos de estudio los Ac IgA reconocen a un grupo heterogéneo de proteínas, sin predominio manifiesto por alguna de ellas. En el grupo de referencia un péptido de 90 kDa se presentó en las cuatro muestras de suero utilizadas (100%); en el grupo de donadores predominó un péptido de 50 kDa en ambas muestras (37% y 58%) y en el grupo de enfermos las moléculas de

62 y 46 kDa fueron las más frecuentes (60, 54; y 70, 0% para suero y saliva, respectivamente). Un dato relevante es la similitud entre algunas de las proteínas reconocidas a partir de los extractos de *N. fowleri* y *E. histolytica*; en la primera se reconocen péptidos de aproximadamente 107, 102, 90, 62, y 46 kDa, y en la segunda de 105, 91, 60 y 46 kDa (Tabla 9). Se han obtenido Ac monoclonales contra *N. fowleri* que reconocen patrones antigénicos heterogéneos con bandas principales con pesos moleculares de 97, 95, 50, 36, 34 y 20 kDa (Sparagano y col., 1993); y moléculas de 160, 104, 93 y 66 kDa (Visvesvara y col., 1987). También se ha identificado, purificado y caracterizado un antígeno de superficie de entre 90 y 96 kDa de *E. histolytica* patógena utilizando Ac monoclonales (Joyce y Ravdin, 1988; Petri y col., 1987 y Torian y col., 1987). Comparando la respuesta sistémica y local para esta clase de Ac no se observa una correlación entre las frecuencias de reconocimiento de los diferentes péptidos, es decir no se reconocieron las mismas proteínas amebianas por los Ac séricos y secretorios

5.2.2. ANTICUERPOS IgM.

En general los Ac IgM reconocen un número menor de proteínas amebianas. Las muestras del grupo de referencia utilizadas no revelaron bandas proteicas de *N. fowleri* por este anticuerpo; no así para el extracto de *E. histolytica* a partir del cual se reconocieron nuevamente las proteínas de 105, 95 y 46 kDa, entre otras.

En las muestras de suero del grupo de donadores los Ac IgM reconocieron dos proteínas que quizá sean de las más importantes del estudio, debido a la repetitividad con la que se presentaron (figura 7); los pesos moleculares de éstas son de 75 y 57 kDa aproximadamente, con frecuencias del 68 y 91%, respectivamente. Ambas moléculas no fueron reconocidas por los Ac presentes en las muestras de saliva correspondientes. Sin embargo sí se reconocieron en algunas de las muestras de suero del grupo de enfermos, con frecuencias del 25 y 58%; y además por Ac IgG de las muestras del grupo de donadores y de enfermos. Proteínas con pesos moleculares semejantes no fueron reconocidas por los Ac correspondientes en los extractos de *E. histolytica*. Ac de las clases IgA e IgG reconocieron proteínas de pesos moleculares similares en *N. fowleri* y *E. histolytica*. Importante es discernir (el origen) la especificidad de éstos, que están reconociendo antígenos que podrían estar involucrados directamente con los mecanismos de patogenicidad en ambas amebas, o bien estar reconociendo antígenos de *N. fowleri* por reacciones cruzadas, lo que podría incluso redituarse en inmunidad protectora hacia estas amebas anfitriónicas. Como se mencionó previamente son varios los trabajos en los que se reporta que ambas especies no están relacionadas antigénicamente; no obstante, el presente trabajo podría contraponer esos resultados, debido a la semejanza en los pesos moleculares de los

péptidos identificados por los diferentes Ac, lo cual sería realmente relevante en un país como el nuestro donde *E. histolytica* es un protozooario endémico.

5.2.3. ANTICUERPOS IgG

Las proteínas más frecuentemente reconocidas por esta clase de Ac tienen pesos moleculares semejantes a las reconocidas por los Ac IgM o IgA. Además de una molécula de 88 kDa se identificaron nuevamente moléculas de 75, 67 y 57 kDa como por los Ac IgM, y otras de 46 y 10 kDa como por los Ac IgA. La más frecuente en ambas muestras del grupo de donadores fue nuevamente la proteína de 57 kDa. Y por los Ac séricos del grupo de enfermos la proteína de 46 kDa. Si consideramos por los pesos moleculares que se trata de las mismas moléculas podríamos (inferir)proponer que las primeras (75, 67 y 57 kDa) están participando en el reconocimiento sistémico primario y secundario a *N. fowleri*; mientras que las segundas (46 y 10 kDa) estarían siendo antigénicas tanto a nivel local como sistémico. Además, el alto contenido de IgG presente en las muestras de saliva del grupo de donadores, que reconocen las mismas proteínas que la IgG sérica, aunque en menor frecuencia, podrían revelar la transudación de esta globulina del suero de estas personas, quizá asociado a problemas de mucosa oral; globulinas específicas que se generaron en la respuesta secundaria a estas amibas. Los resultados a este nivel en el grupo de enfermos hubieran sido importantes debido al gran número de muestras obtenidas de pacientes con rinitis, sin embargo estas pruebas no se realizaron por la cantidad tan baja de las mismas. Toney y Marciano- Cabral (1992) identificaron glicoproteínas de superficie de *N. fowleri* patógena relacionadas con su resistencia a la lisis por el complemento; encontrando por electroforesis proteínas de 89, 60, 44 y 28 kDa. Una proteína de 36 kDa también fue reconocida por esta clase de anticuerpos, siendo semejante en peso al material citopatógeno de la amiba *Naegleria* (NACM) (Dunnebacke y Dixon, 1989).

Sean cuales sean los orígenes y mecanismos de inducción de los Ac que reconocen proteínas de *N. fowleri*: inmunización específica o reacción cruzada, estos anticuerpos pueden participar en la resistencia contra la invasión, probablemente inhibiendo la adherencia de los trofozoítos a nivel mucosal u opsonizándolas a nivel sistémico. Queda no obstante por establecer la importancia de cada una de las clases de anticuerpos estudiadas; así como el papel inmunógeno de las proteínas reconocidas con mayor frecuencia por los mismos.

Los datos de este estudio en México documenta la presencia de anticuerpos secretorios que reaccionan con el agente causal de la MEAP y sugiere a futuro la posibilidad de usar inmunoblots para obtener proteínas de importancia inmunogénica que permitan detectar individuos infectados con este patógeno.

6. CONCLUSIONES

El presente estudio confirma la presencia de Ac específicos para *N. fowleri* en poblaciones humanas a nivel sistémico; y demuestra su presencia en la saliva humana; principalmente de la clase IgA y en menor grado IgM e IgG. Ac que podrían estar jugando un papel a nivel local en la protección contra la infección por estas amebas.

Los niveles de Ac anti- *N. fowleri* son diferentes en los tres grupos de estudio. Siendo en los grupos del área endémica donde se obtuvieron los niveles mayores; lo cual apoya la hipótesis de mayor contacto entre *N. fowleri* y la población de San Luis Potosí y Cd. Valles.

En el grupo de enfermos se presentaron los niveles mayores de Ac anti-*N. fowleri* y a pesar de no ser enfermos específicos de MEAP, sus niveles señalan un contacto cercano entre ellos y estas amebas

El análisis de inmunoblots permitió identificar algunas proteínas amebianas importantes dada su frecuencia de reactividad en las muestras del área endémica. Moléculas de 102, 62, 50 y 46 kDa son reconocidas por Ac IgA. Las proteínas de 57, 67y 75 kDa son las más importantes en el reconocimiento por los Ac IgM. Y para los Ac IgG nuevamente las de 75, 57 y 46 kDa son las mas relevantes.

La comparación de las proteínas inmunoreactivas de *N. fowleri* y *Entamoeba histolytica* en el análisis de inmunoblots, considerando únicamente su peso molecular, permiten inferir algunas relaciones antigénicas entre ambas especies Sin embargo estudios de adsorción deben ser realizados para poder afirmar la reactividad cruzada entre ambas.

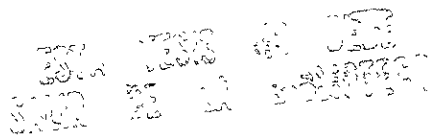
Discernir entre la relación antigénica de ambas especies es importante en un país como el nuestro en el que la amebiasis es un problema de salud pública. Además de ser necesaria la utilización de ambas especies en estudios serológicos en los que se deba eliminar cualquier duda al respecto.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A and Pober, J. (1995). Inmunología celular y molecular. McGraw-Hill Interamericana 2a. De España
- Anderson, K., and Jamieson, A (1972). Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* ii: 902-903.
- Benson, R.L., Ansbacher, L, Hutchison, R.E. and Rogers, W. (1985) Cerebrospinal fluid centrifuge analysis in primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* *Arch Pathol Lab. Med.* 109: 668-671.
- Bradford, M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative of microgramme quantities of protein, utilizing the principle of protein- dye binding *Anal Bio.* 72:248-254
- Brown, T (1979a). Inhibition by amoeba-specific antiserum and by cytochalasin B of the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *J Med Microbiol.* 12: 355- 362.
- Brown T (1979b). Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo cell cultures *J. Med Microbiol.* 12. 363- 371
- Bush, L E and John, D.T (1988) Intranasal immunization of mice against *Naegleria fowleri* *J. Protozool* 35:172-176
- Cain, A.R. R, Mann, P G., and Warhurst, D C. (1979). IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* y 441
- Carter, R. F. (1970). Description of a *Naegleria sp* isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it *J. Pathol.* 100 217-244
- Carter, R F (1972). Primary amoebic meningo-encephalitis An appraisal of present knowledge *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* 66: 193-213
- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E, and Suárez, G *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research* 27: 579-586.
- Chang, S.L (1974). Etiological, pathological, epidemiological, and diagnostical consideration of primary amoebic meningoencephalitis. *CRC Crit Rev. Microbiol* 3 135-159
- Chang, S L (1978). Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol.* 35 368-375
- Chang, S L (1979). Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba *Folia Parasitol Prague* 26: 195-200
- Cursons, R T, Brown, T. J., and Keys, E A. (1978). Virulence of pathogenic free-living amoebae. *J Parasitol* 64: 744-745
- Cursons, R. T M., Keys, E. A., Brown, T. J., Learmonth, J, Campbell, C. and Metcalf, P (1979). IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet.* i.223-224.
- Cursons, R T M., Brown, T J., Keys, E A. Moriarty, K M., and Till, D (1980) Immunity to pathogenetic free-living amoeba Role of humoral antibody *Infect Immun* 29 401-407
- Dubray, B L, Wilhelm, W. E., and Jennings. B R (1987). Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* in a hospital survey *J. Protozool* 34 322-327

- Duma, R. J. Rosembiu, W. L., McGhehee, R. F., Jones, M. M., and Nelson, E. C (1971). Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin and a review. *Ann. Inter. Med.* 74:923-931
- Dunnebacke, T. H., and Schuster, F. L. (1985) Morphological response of cultured cells to *Naegleria* amoeba cytopathogenic material. *J. Cell Sci.* 75: 1-16
- Dunnebacke, T. H., and Dixon, J. S. (1989). NACM, a cytopathogen from *Naegleria* amoeba. Purification, production of monoclonal antibody, and immunoreactive material in NACM-treated vertebrate cell cultures. *J. Cell Sci.* 93 391-401.
- Eisen, D., and Franson, R. (1987). Acid- active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit alveolar macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 369-372.
- Ferrante, A., and Thong, Y.H. (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasitol.* 9: 599-601
- Ferrante, A., and Rowan-Kelly, B. (1988) The role of antibody in immunity against experimental naegleria meningoencephalitis ("amoebic meningitis"). *Immunology* 64. 241-244.
- Ferrante, A. (1991) Free- living amoebae: Pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology.* 13. 31-47
- Flores, B. M., García, C. A., Stamm, W. E., and Torian, B. E. (1990). Differentiation of *Naegleria fowleri* from *Acanthamoeba* species by using monoclonal antibodies and flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 28 (9) 1999-2005
- Fulton, C. (1977) Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:597-629
- Gonzalez-Robles, A., and Martinez-Palomo, A. (1983) Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 30: 692-700.
- Gorospe, S., Band, R. N., and Kopachik, W. J. (1996). Molecular cloning of, and phylogenetic analysis of, an actin in *Naegleria fowleri*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 1, (2-3) 233-237.
- Haggerty, R.M., and John, D.T. (1978) Inmate resistance of mice to experimental infection with *Naegleria fowleri*. *Infect. Immunity* 20 73-77
- Haggerty, R.M., and John, D.T. (1982). Serum agglutination and immunoglobulin levels of mice infected with *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 29: 117-122
- Hysmith, R. M., and Franson, R.C. (1982a). Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta* 711: 26-32
- Hysmith, R. M., and Franson, R.C. (1982b) Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta* 712: 698-701.
- John, D. T., Weik, R. R., and Adams, A. C. (1977) Immunization of mice against *Naegleria fowleri* infection. *Infect. Immun.* 16 817-820.
- John, D. T., Cole, T. B. Jr., and Marciano-Cabral, F. M. (1984). Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:12-14
- John, D. T., and De Jonckheere, J. F. (1985) Isolation of *Naegleria australiensis* from Oklahoma lake. *J. Protozool.* 32:571-575
- John, D. T. (1993) Parasitic protozoa. 2nd edition Edited by Julius P. Kreier and John R. Baker. Academic Press Inc., U.S.A.

- Joyce, M. P., and Ravdin, J. I. (1988). Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 74-80
- Kilvington, S., Mann, P., and Warhurst, D. (1984) Differentiation between *Naegleria fowleri* and *N. lovaniensis* using isoenzyme electrophoresis of aspartate aminotransferase. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 562
- Kobayashi, G.S., and Medoff, G. (1977) Antifungal agents: Recent developments. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 291-308.
- Marciano-Cabral, F., Cline, M. L., and Bradley, S. G. (1987) Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria fowleri* species. *J. Clin. Microbiol.* 25: 692-697
- Martínez, A. J. (1985) Free-living amoebas. Natural history, Prevention, Diagnosis, Pathology, and treatment of Disease. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Omaña, M. M. (1995) Queratitis Amebiana en México. ENEPI- UNAM. Tesis de Licenciatura
- Ortiz, R., Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Gallegos, E., y Calderón, A. (1993) Gimnamoebas presentes en dos épocas del año en cuerpos de agua dulce en la región de la Huasteca Potosina. *Memorias del IX Congreso Nal. Y Congreso Intern. de AIDIS de norte América y del Caribe.* D.F
- Page, F. C. (1974). *Rosculus itnacus* Hawes, 1963 (amoebida, Flabellulidae) and amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozool.* 13:143-154
- Petri, W. A., Jr., Joyce, M. P., Broman, J., Smith, R. D., Murphy, C. F., and Ravdin, J. I. (1987). Recognition of the galactose- or N-acetyl-galactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect Immun.* 55: 2327-2331
- Powell, E., Newsom, A., Allen, S., and Knudson, G. (1992). Identification of antigens of pathogenic free living amoebae by protein immunoblotting with rabbit immune and human sera. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 1(5): 493-499
- Reilly, M. F., Bradley, M. K., and Bradley, S. G. (1982) Agglutination of *Naegleria fowleri* by human serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 170:209-212.
- Reilly, M. F., Marciano-Cabral, F., Bradley, D. W., and Bradley, S. G. (1983) Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *J. Clin. Microbiol.* 17:576-581.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E., and Medina, F. (1983) A survey of pathogenic and free-living amoeba inhabiting swimming pool in Mexico City. *Environ. Res.* 32: 205-212
- Rivera, F., Rosas, Y., Castillo, M., Chávez, M., Gómez, R., Chao, R., and Islas, J. (1986) Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ. Res.* 39: 364-371.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, Y., Ramírez, E., Bonilla, P., and Lares (1987) Amoebas isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.* 42: 149-154
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J.J., Rodríguez, S., and Alcocer, J. (1989a) Pathogenic amoebae in natural waters of three resorts of Hidalgo, México. *Environ. Res.* 50: 289-295.
- Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ramírez, J., Xóchihua, L., y Guzmán, H. (1989b) *Acanthamoeba* spp. en quemaduras infectadas y rinitis. *Rev. Lat. de Microbiol.* 31: 137-140



- Rivera, F, Lares, F, Morayta, A, Bonilla, P, Ramírez, E, Xóchihua, L., y Calderón, A. (1989c). Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeningocele por *Naegleria lovaniensis*. Rev. Lat. Enf. Inf Ped II (9): 91-94
- Rivera F., Bonilla. P, Ramírez,E, Gallegos,E, Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D, and Rivera, V (1994). Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico and its suburbs. Water, Air and Soil Pollution. 74: 65-87.
- Rodríguez-Zaragoza, S, Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., and Hernández, D. (1993). Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, S.L.P. Mexico. J. Expo. Analy. and Environ. Epidio. 3:229-241
- Rowan-Kelly, B., Ferrante, A., and Thong, Y. H. (1980). Activation of complement by *Naegleria* Trans. Roy. Trop Med Hyg 74 (3) 333-336.
- Ryu, J.S, and Im, K. I (1992). The production and characterization of anti-*Naegleria fowleri* monoclonal antibodies. Kisaengchunghak-Chapchi 30 (1) 33-41
- Sadaka, H.A, El Nassery,S.F, Samra, L.M., and Awadalla,H. (1994). Isolation and identification of free living amoebae from some water source in Alexandria. J.Egypt Soc Parasitol. 24(2). 247-257.
- Sathar, M.A., Bredenkamp, B. L. F, Gathiram, V, Simjee, A. E., and Jackson, T. F. (1990) Detection of *Entamoeba histolytica* Immunoglobulins G and M to Plasma Membrane Antigen by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay J. of Clin. Microbiol Vol.28.No.2: 332-335.
- Seidel, J. S., Harmats, P, Visvesvara, G. S, Cohen, A, Edwards, J., and Turner, J (1982) Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. New Engl J Med 306:346-348.
- Sparagano, O, Drouet, E., Brebant, R, Manet, E., Denoyel, G. A, and Pernin, P (1993) Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (Cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species J. Clin. Microbiol 31 (10): 2758-2763
- Stevens, A. R., Shulman, S. T, Lansen, T. A, Cichon, M J., and Wiliart, E (1981) Primary amoebic meningoencephalitis: A report of two cases and antibiotic and immunologic studies J Infect. Dis 143 193-199
- Thong, Y. H., Ferrante, A, Rowan-Kelly, B. and O' Keefe, D (1980). Immunization with live amoebae, amoebic lysate and culture supernatant in experimental *Naegleria* meningoencephalitis. Trans. Roy Soc Trop Med Hyg. 74 570-576
- Toney, D, and Marciano-Cabral, F (1992) Alterations in protein expression and complement resistance of pathogenic *Naegleria* amoebae. Infect. Immun. 60. 2784- 2790
- Toney, D, and Marciano-Cabral, F. (1994) Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amoebae as a mechanism for resisting complement damage J Immun 152(6) 2952-2959.
- Torian, B E, Lukehart, S A., and Stamm, W E (1987) Use of monoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96,000- dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Infect Dis. 156 334- 343
- Visvesvara, G S., and Healy, G.R (1975). Comparative antigenic analysis of pathogenic and free-living *Naegleria* species by the gel diffusion and immunoelectrophoresis techniques Inf. and Immun 11 (1) 98-108.

- Visvesvara, G. S., Peralta, M.J., Brandt, F.H., Wilson, M., Aloisic, C., and Franko, E (1987). Production of monoclonal antibodies to *Naegleria fowleri*, agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J. Clin Microbiol.* 25 (9): 1629- 1634.
- Visvesvara, G. S., Schuster, F. L., and Martinez, J (1993) *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp, agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk Microbiol.* 40 (4):504- 514
- Whiteman, L.Y, and Marciano-Cabral, F (1987). Susceptibility of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp to complement-mediated lysis. *Infect. Immun* 55 2442-2447
- Willaert, E., Jadin, B., and Le Ray, D (1973). Comparative antigenic analysis of *Naegleria* species. *Ann Soc. belge Med. Trop.* 53: 59-61
- Willaert, E., Jamieson, A., Jadin, J.B and Anderson, K. (1974). Epidemiological and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*. *Ann. Soc belge Med. Trop* 54 333- 342
- Willaert, E, De Jonckheere, J.F., and Oktem, N (1977) Immunoelectrophoretic study of an environmental, pathogenic *Naegleria fowleri*, isolated in Belgium. *J Parasitol.* 63(2)
- Young, M. D., Willaert, E, Neal, F C., Simpson, C. F., and Stevens, A. R (1980). Experimental infection of sheep with *Naegleria fowleri* of human origin. *Am. J Trop Med Hyg.* 29: 476- 477

8. APÉNDICE

I. REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE ELISA:

REGULADOR DE RECUBRIMIENTO. (R. de carbonato-bicarbonato pH 9.6)

Carbonato de sodio anhidro	Na_2CO_3	1.59 g.
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	2.93g.
Agua destilada	H_2O	1000 ml

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS- 10X pH 7.2)

Cloruro de sodio	NaCl	80 g.
Cloruro de potasio	KCl	2 g.
Fosfato de sodio anhidro dibásico	Na_2HPO_4	11.5 g
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	2 g.
Agua destilada	H_2O	1000 ml

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS . (PBS- 1X pH 7.2)

PBS 10X	100 ml
Agua destilada	900 ml.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS/ TWEEN. (PBS- 1X / TWEEN)

PBS 10X	100 ml
Tween 20	0.5 ml
Agua destilada	900 ml.

ANTICUERPOS DE AFINIDAD PURIFICADOS

CONJUGADOS DE CABRA ANTI-IgA, IgM E IgG HUMANOS MARCADOS
CON PEROXIDASA.

REGULADOR DEL SUSTRATO
(CITRATO- FOSFATO ph 5.0)

A) Ácido cítrico	$\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2 \text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	19.2 g
Agua destilada	H_2O	1000 ml
B) Fosfato de sodio anhidro dibásico	Na_2HPO_4	2.8 g
Agua destilada	H_2O	1000 ml

Antes de emplearse se mezclan.

Solución A	24.3 ml
Solución B	25.7 ml
Agua destilada	50 ml

Se mide el pH y se ajusta a 5.0.

Al momento de usarse se agrega:

Orto-fenilendiamina	40 mg
Peróxido de hidrógeno (30%)	H_2O_2 40 μl .

II. REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE INMUNOBLOTS:

FILTRAR TODAS LAS SOLUCIONES A TRAVÉS DE UN FILTRO DE 0.45 μ M USAR SIEMPRE AGUA BIDESTILADA.

SOLUCIÓN STOCK DE MONÓMEROS

(30% T, 2.7% C BIS)

Acrilamida		60.0 g
Bis- Acrilamida		1.6 g
Agua	Aforar	200 ml.

Almacenar en frasco ámbar a 4°C .

AMORTIGUADOR DEL GEL SEPARADOR 4X

(1.5 M TRIS-CL, pH 8.8)

Trizma- Base		36.3 g.
Ajustar a pH 8.8 con HCl		
Agua	Aforar	200 ML.

AMORTIGUADOR DEL GEL CONCENTRADOR 4X

(0.5 M TRIS- CL, PH 6.8)

trizma- base		3.0 g
Ajustar a ph 6.8 con HCl		
Agua	Aforar	50 ml.

LAURIL SULFATO

SDS (10%)		5.0 g
Agua	Aforar	50 ml.

INICIADOR

Persulfato de amonio		1.0 g
Agua	Aforar	1.0 ml

PREPARACIÓN DEL GEL

(BASADO EN EL SISTEMA DE LAEMMLI MODIFICADO PARA LAS UNIDADES DE ELECTROFORESIS MIGHTY SMALL).

	Gel Separador	Gel Concentrador
Sol. de acrilamida	3.33 ml	0.67 ml
Amort del Gel Separador 4x	2.50 ml	
Amort del Gel Concentrador 4x		1.25 ml
Lauril sulfato (10%)	0.10 ml	0.05 ml
Agua	4.00 ml	3.00 ml
Iniciador	50 μ l	25 μ l
Tetrametilendiamuna (TEMED)	5.0 μ l	2.0 μ l

Adicionar sobre el gel separador 100µl de butanol saturado con agua, para evitar la inhibición de la polimerización por el oxígeno.

AMORTIGUADOR DE TRATAMIENTO

AMORT 2X DE SDS (TRIS- Cl 0.125 M, PH 6.8, SDS 4%, GLICEROL 20%, 2-MERCAPTOETANOL 10%)

Tris-Cl 4x, pH 6.8		2.5 ml
SDS 10%		4.0 ml
Glicerol		2.0 ml
2- Mercaptoetanol		0.2 ml
Azul De Bromofenol		0.2 mg
Agua	Aforar	10.0 ml.

Dividir en alícuotas de 1.0 ml y almacenar entre -40°C y -80°C

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORÉSIS

(TRIS 0.025 M, pH 8.3, GLICINA 0.192 M, SDS 0.1%)

Tris- Base		12.1 g
Glicina		57.6 g
SDS		4.0 g
Agua	Aforar	4.0 Lt.

MARCADOR SIGMA (P.M. ALTO RANGO)

Se utiliza en alícuotas de 3 µl adicionando 7µl de amortiguador de tratamiento.

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

(TRIS 0.025 M, pH 8.3, GLICINA 0.192 M, SDS 0.1%)

Tris- Base		6.06 g
Glicina		28.8 g
SDS		2.0 g
Agua		1.3 l
Metanol		400 ml
Agua	Aforar	2.0 lt.

No ajustar el pH, deberá ser entre 8.2- 8.4.

Si se requiere teñir el gel se utilizan las siguientes soluciones:

COLORANTE

(AZUL DE COOMASSIE R-250 0.025%, METANOL 40%, ACIDO ACETICO 7%)

Azul de Coomassie R-250		0.5 g
Metanol		800 ml
Ácido Acético		140 ml
Agua	Aforar	2.0 lt.

SOLUCIÓN DESTENIDORA I

(METANOL 40%, ACIDO ACÉTICO 7%)

Metanol		400 ml
Ácido Acético		70 ml
Agua	Aforar	1.0 lt.

SOLUCIÓN DESTENIDORA II

(METANOL 5%, ACIDO ACETICO 7%)

Metanol		500 ml
Ácido Acético		70 ml
Agua	Aforar	1.0 lt.

Las soluciones que se utilizan en la fase de inmunodeteccion y que son también utilizadas en la técnica de ELISA son descritas en el apéndice anterior.

SUSTRATO Y CROMÓGENO

Metanol		3.5 ml
4-Cloro 1-Naftol		10 mg
PBS		16.5 ml
Peróxido de Hidrógeno		20.0 μ i

Se mezclan ambas soluciones antes de su uso