



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA
PRIMARIA, CARACTERIZACIÓN ACTUAL
DEL AGENTE CAUSAL, Naegleria fowleri.**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

SERGIO RICARDO BLANCO DIAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY



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.

AGRADECIMIENTOS

Como saben los que me acompañaron en este camino, lograr terminar es producto de la tenacidad sobre innumerables obstáculos. Por ello, en mi memoria los tengo presentes a todos y cada uno, de los que en su momento me prestaron su apoyo estoico, intelectual, cultural, material, moral, o económico y con hondo sentimiento les doy las gracias.

Y sobre todo a **Tí**, que por tu impulso y consejo de superación me encuentro escribiendo esto.

Ahora guardando las formas institucionales debo agradecer de manera especial y sincera al Doctor en Ciencias **Marco Aurelio Rodríguez Monroy** por su apoyo y confianza al aceptarme para realizar esta tesina bajo su dirección.

También quiero reconocer a los profesores que nos impartieron este seminario pues me recordaron el porque estudié esta Carrera y me dieron un nuevo ánimo para seguir con mis ideales.

Le agradezco también al Dr. **Sergio Cházaro Olivera** por apoyarnos a mi y a mis compañeros con este medio para cumplir este anhelo.

DEDICATORIA

A mis padres

Al amor de mi
vida

A mi familia
y amigos

A los que con
su tenacidad y
esfuerzo logran
hacer cambios
en este mundo y
consiguen el
éxito en sus
empresas.

Índice

I.	RESUMEN.....	5
II.	INTRODUCCIÓN.....	5
III.	CICLO DE VIDA Y MORFOLOGÍA.....	8
IV.	ECOLOGÍA.....	11
V.	EPIDEMIOLOGÍA.....	12
VI.	MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA.....	15
VII.	TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO.....	16
VIII.	INMUNIDAD.....	18
IX.	DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	19
X.	REFERENCIAS.....	23

MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA, CARACTERIZACIÓN ACTUAL DEL AGENTE CAUSAL, *Naegleria fowleri*.

I. Resumen.

El conocimiento de que las amebas de vida libre son capaces de ocasionar enfermedades en humanos tiene alrededor de 50 años, antes del cual eran consideradas como organismos del suelo que eran inocuos o, cuando mucho, comensales en mamíferos. *Naegleria fowleri* es oportunista y se presenta principalmente en huéspedes inmuno-competentes. Esta especie tiene una distribución cosmopolita en suelo y agua, teniendo múltiples puntos de contacto con humanos y animales, como lo revelan los títulos de anticuerpos encontrados en las poblaciones humanas estudiadas. El número de infecciones ocasionadas es bajo, en comparación con otras parasitosis protozoarias (tripanosomiasis, toxoplasmosis, malaria, etc.), sin embargo la dificultad de diagnosticarla, el reto de encontrar tratamientos antimicrobianos óptimos; la morbilidad y alta mortandad asociadas, han sido causa de preocupación para médicos y parasitólogos. Esta revisión presenta la información acerca de la especie *Naegleria fowleri*: su morfología y ciclo de vida, cultivo en laboratorio, ecología, epidemiología, naturaleza de la infección, y la terapias anti-microbiana adecuada, la respuesta inmune y los procedimientos de diagnóstico molecular que han sido desarrollados para identificarla en el entorno y en los especímenes clínicos.

II. Introducción

Algunas de las amebas de vida libre pueden ser parásitas, pero éstas no están bien adaptadas, por lo que casi invariablemente matan a sus huéspedes en lugar de evolucionar, como lo han hecho los parásitos, a un estado de de'tente con sus huéspedes. Además, al ser de vida libre y estar ampliamente distribuidos en la naturaleza, no dependen de un huésped para transmitirse y dispersarse, y tampoco necesitan de la transmisión huésped-huésped para ocurrir. Ejemplo de estas amebas son *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, *Sappinia diploidea*, y otras que, por su habilidad para sobrevivir dentro de un huésped mamífero, están pre-adaptadas a un estilo de vida pseudoparasitario y potencialmente patógeno. Estos organismos han sido llamados amebas anfitriónicas,

reconociendo su capacidad de vivir de manera endozóica y de seguir siendo capaces de tener una existencia de vida libre (Page, 1974).

El primer caso humano de meningoencefalitis amebiana fue reportado en Australia, pero el agente etiológico, que de manera inicial se creía que era *Acanthamoeba*, fue posteriormente identificado como *Naegleria* (Fowler and Carter, 1965). Martínez caracterizó las infecciones de *Acanthamoeba* como infecciones oportunistas, quien también reconoció su ocurrencia en pacientes debilitados o enfermos crónicos, y quien distinguió entre las patologías ocasionadas por *Acanthamoeba* y *Naegleria* (Martinez, 1980).

En la actualidad, la taxonomía de las amebas de vida libre es controversial y está sujeta a cambio, reflejando los nuevos datos que surgen de los estudios de las secuencias genómicas (De Jonckheere, 2004). Las amebas son un grupo polifilético, con stocks que surgen de diferentes ramas del árbol de los ancestros protozoarios. Con base en los datos de secuenciación de los rRNA 16S, *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, están estrechamente relacionadas (Amaral Zettler et al., 2000; Booton et al., 2003a), pero genéticamente distantes de *Naegleria* y Sappinia.

Naegleria fowleri ocasiona una meningoencefalitis no oportunista, pero devastadora y rápidamente fatal (meningoencefalitis amebiana primaria) en niños y jóvenes inmunocompetentes. Esta enfermedad no tiene especificidad de huésped. La siguiente Tabla presenta las características del género y las enfermedades que ocasiona.

Naegleria fowleri

Ameba trófica	15-30 mm, conseudópodo anterior, eruptivo, ectoplásmico; velocidad w 1.0 mm/s
Etapaflagelada	Se transforma en flagelados, típicamente con dos flagelos
Etapacística	Pared de dos capas con poros; diámetro de 7-15 mm; los quistes no se forman en el tejido cerebral
Hábitat	Suelo; aguas dulces tibias; corrientes de agua con contaminación térmica.
Enfermedades	Principalmente Meningoencefalitis amebiana

Factores de riesgo	Actividad en agua dulce cálida; introducción del agua por la nariz (aspiración)
Diagnosís	Examen CSF para amebas tróficás
Periodo de incubación	Días
Síntomas	Dolor de cabeza, fiebre, conducta anormal
CSF	WBCs y proteína elevadas; nivel de glucosa de normal a bajo.
Terapia Anti-Microbiana	Anfotericina B, rifampina, miconazol
Prognosis para recuperación	Malo
Número estimado de casos	~ 200

Alrededor de 90% de las amebas (incluyendo a *Acanthamoeba* y *Naegleria*), aisladas de estanques (Oklahoma) durante los meses de verano fueron termotolerantes; y de ellas -2% fueron patógenas para ratones (John and Howard, 1996). *Acanthamoeba* (y *Naegleria*) han sido aisladas de las superficies de los epitelios nasales de humanos sanos (Cerva et al., 1973; Abraham and Lawande, 1982; Michel et al., 1982; Rivera et al., 1986; Badenoch et al., 1988), particularmente en periodos de fuertes vientos, tales como el harmattan africano (Lawande et al., 1979).

Naegleria fowleri es el agente causal de la meningoencefalitis primaria (MAP). Los miembros de *Naegleria spp.* son amebas flageladas que se encuentran en el suelo y el agua. En general, son más sensibles a condiciones ambientales como la desecación y el pH extremo, y no pueden sobrevivir en agua marina. Sin embargo, se han reconocido alrededor de 30 especies de *Naegleria* con base en los datos de la secuenciación (De Jonckheere, 2004), *N. fowleri* es la única que ha sido aislada de casos de Meningoencefalitis amebiana. Otras especies (*Naegleria australiensis*, *Naegleria italica*, *Naegleria philippinensis*), podrían ser patógenas en el modelo de MAP en ratón, pero no se han identificado en ningún caso humano. Debido a que crece mejor a temperaturas elevadas, las amebas han sido aisladas de cuerpos de agua caliente, incluyendo lagos y embalses artificiales, aguas termales, y arroyos y ríos con contaminación térmica. En Estados Unidos, los meses de

verano son la época donde la ocurrencia es más probable. *Naegleria fowleri* es termotolerante, y es capaz de sobrevivir a temperaturas de hasta 45°C, pre-adaptando a la especie para la temperatura corporal de los mamíferos.

De hecho, la incubación a 45°C se utiliza de manera rutinaria para aislar a la ameba de las muestras de agua, dada la supresión del crecimiento de otras amebas en las muestras (De Jonckheere and van de Voorde, 1977b). Pero la termotolerancia no es el único factor que determina la patogenicidad de *Naegleria spp.* *Naegleria lovaniensis* es una especie termotolerante, pero no es patógena en el modelo de ratón para MAP (De Jonckheere and van de Voorde, 1977a; Stevens et al., 1980).

La MAP es una enfermedad fulminante, que se desarrolla pocos días después de la exposición, y que ocasiona la muerte una o dos semanas después de la hospitalización. Parcialmente debido a la rápida aparición de la infección, y parcialmente debido al retraso en el diagnóstico, pocos individuos sobreviven. La habilidad de *N. fowleri* para producir una infección tan rápidamente fatal ha impulsado la búsqueda de las propiedades virulentas de la ameba que pudieran ser responsables de su destructividad. Entre los candidatos que pudieran servir como factores de virulencia están la liberación de las enzimas fosfolipasa (Cursons et al., 1978), o neuraminidasa (Eisen and Franson, 1987), la creación de poros en las membranas de las células objetivo que pudieran tener un efecto lítico (Young and Lowrey, 1989), y la agresiva actividad fagocítica (Brown, 1979). La etapa ameboide forma copas alimenticias (food cups) (amebostomas) que son capaces de dar pequeños mordiscos al citoplasma de la célula objetivo (Brown, 1979; John et al., 1985).

III. Ciclo de vida y morfología.

El ciclo de vida de *Naegleria* incluye etapas ameboides y quísticas, así como una etapa flagelada que se desarrolla a partir de la ameba.

La ameba trófica tiene un patrón de locomoción baboso distintivo, con uno o más pseudópodos ectoplásmicos (Fig. 1 y 1a).

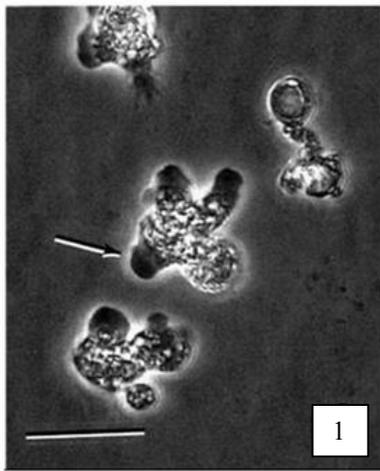


Fig. 1. Ameba trófica. Los pseudópodos ectoplásmicos protuberantes, característica distintiva del organismo (flecha) micrografía de contraste de fases. Barra mide 20 μm .



Figura 1A. Esquema del trofozoito; mide 15 a 25 μm y presenta lobopodos

El flagelado surge cuando la ameba pasa a través de una transformación morfogénica (durante 30-60 min), que es activada por la suspensión en agua, en esta etapa transitoria, no se alimenta ni se divide (Fig. 2 y 2a). Se cree que el flagelado juega algún papel en la dispersión de las amebas en sus hábitats normales en el suelo o el agua. Sin embargo, existen varias especies de *Naegleria*, identificadas como tales por sus secuencias genómicas, que carecen de la etapa flagelada, o cuyo flagelado puede dividirse (De Jonckheere, 2002).

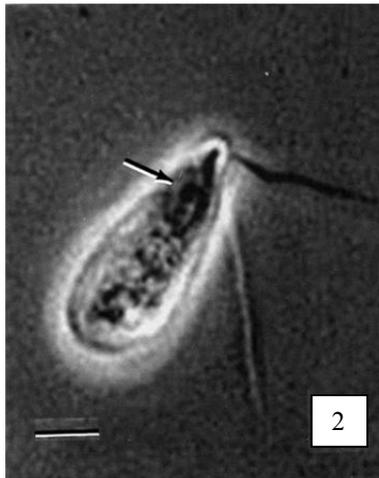


Fig.2. Flagelado. Flagelos se extienden desde el extremo anterior del organismo, núcleo vesicular (flecha). Micrografía de contraste de fases. La barra mide 8 μm

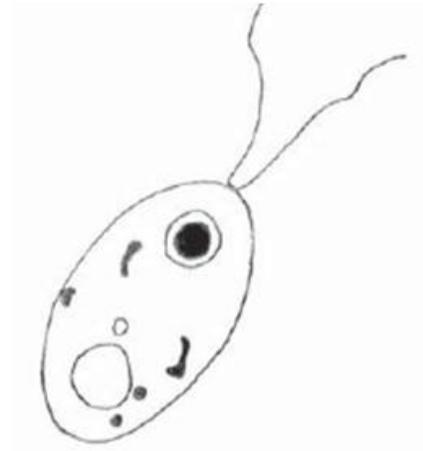


Figura 1B. Esquema de la forma ameboflagelada; mide 12 a 18 μm y tiene habitualmente dos flagelos

La etapa de quiste tiene una doble pared con poros (Fig. 3y 3a). Todos los miembros de *Naegleria spp.* son morfológicamente similares, si no idénticas entre sí, aunque podrían encontrarse algunas diferencias entre ellas, por ejemplo, en la estructura de los poros del quiste (Pussard and Pons, 1979). El ciclo de vida completo se ilustra en la figura 4.

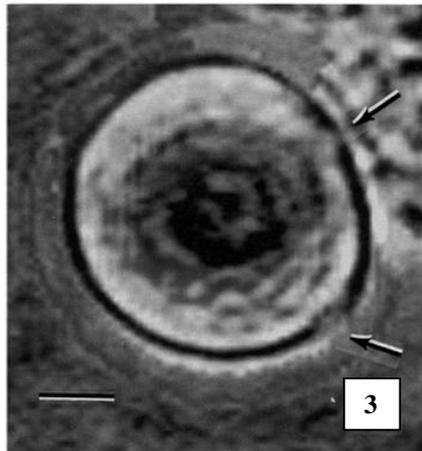


Fig. 3. Quiste. Los poros en la pared (flecha), están al ras de la superficie del quiste. El núcleo es visible en la parte central. Barra mide 4 μ m

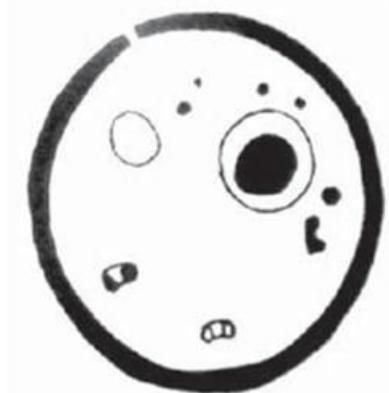
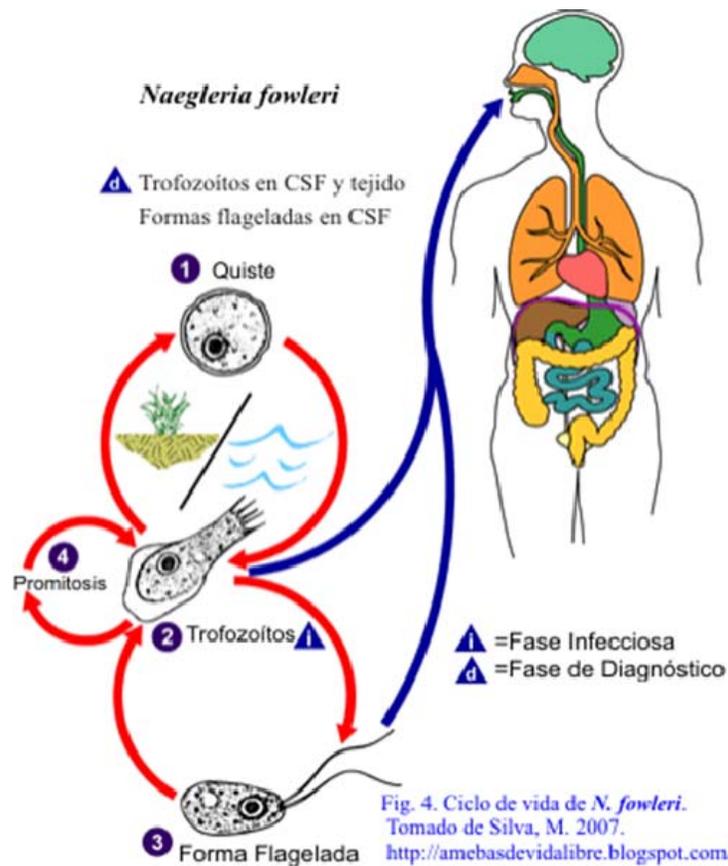


Figura 1C. Esquema de un quiste de *Naegleria fowleri*; mide 8 a 12 μ y presenta uno o dos poros aplanados.



En la naturaleza y en el laboratorio, la ameba se alimenta activamente de bacterias. Los aislados de *N. fowleri* a partir de muestras ambientales de suelo o agua, se logran haciéndolas crecer en placas de agar recubiertas con *E. coli* a 45°C (Lares-Villa et al., 1993). Otras bacterias (preferiblemente de cepas no mucoides), tales como *Enterobacter aerogenes* o *Klebsiella pneumoniae*, también pueden ser utilizadas. Una vez establecidas in vitro, las amebas también crecen en medio axénico (incluyendo un medio totalmente definido), después de eliminar a las bacterias del cultivo con un tratamiento antibiótico (Schuster, 2002). Sorpresivamente, *N. fowleri*, la especie patogénica, tiene menores demandas nutricionales que *Naegleria gruberi*, su contraparte no patógena. Esta diferencia en el crecimiento in vitro de especies patógenas y no patógenas, ha sido utilizada como medio para identificarlas entre sí (De Jonckheere, 1977). Las cepas patógenas también pueden crecer en cultivos de tejido a 37°C, produciendo un efecto citopatogénico que varía con la virulencia del aislado (John and John, 1989).

IV. Ecología

Ha habido un gran interés en la ecología de *N. fowleri*, dado que la presencia de la ameba en aguas recreativas es una amenaza para los seres humanos. Las aguas dulces y cálidas, asociadas con una gran provisión de alimento bacteriano son hábitats ideales para estas amebas. Muchas infecciones han ocurrido como resultado de que las personas nadan en cuerpos de agua artificiales, hábitats naturales perturbados, o áreas donde el suelo está en contacto con aguas no cloradas o no filtradas. En Francia, por ejemplo, donde las aguas del enfriamiento de las plantas de energía nuclear son liberadas en los ríos, el interés en el problema ha llevado a la implementación de monitoreos corriente abajo, para prevenir el sobre-crecimiento y dispersión de *N. fowleri*. Las autoridades francesas han considerado que las aguas que contienen ≥ 100 amebas *N. fowleri* /l son inadecuadas para nadar, debido al incremento en la probabilidad de infección (Cabanes et al., 2001). Un estándar más estricto, de 5 *Naeglerias* termofílicas/l ha sido adoptado en un parque de esquí acuático en la parte Oeste de Australia (Lugg and Psaila-Savona, 2001). Supuestamente, las condiciones locales y los factores de riesgo dictarían las variaciones locales en los estándares. Un estudio de las amebas de una alberca (~23 °C), implicada en un brote de MAP (ver abajo), reveló concentraciones de 10^2 a 10^3 amebas/l de agua, ninguna de las cuales fue una *Naegleria* patógena (Cerva, 1971). Tuvieron transcurrir muchos años antes de que *N. fowleri* fuera aislada, y para que se desarrollara el conocimiento del sitio en el que el patógeno se estaba “escondiendo” en la alberca (Kadlec et al., 1980).

La hipótesis de nicho “vacío” del flagelado busca explicar el éxito de *N. fowleri* en estos tipos de hábitats (Griffin, 1983). Ésta sugiere que la perturbación del medio ambiente por las acciones humanas (por ejemplo, contaminación térmica), resulta en la supresión de la fauna protozoaria normal termosensible, eliminando así la competencia y abriendo el hábitat, que ahora está “vacío” a la colonización de *N. fowleri*. El amiboflagelado termotolerante tiene la ventaja adicional de un estadio flagelado móvil que ayuda a su dispersión. Incluso la presencia de una baja concentración de cloro libre en el agua puede abrir el hábitat para *N. fowleri*, al destruir a la comunidad protozoaria residente.

La relación entre la ecología de *N. fowleri* y la enfermedad, está bien ilustrada por un brote de MAP asociado con una alberca en Ustí nad Labem, Checoslovaquia (Cerva and Novak,

1968). Aquí, una confluencia de agua tibia, una concentración baja de cloro libre, materia orgánica suspendida y bañistas recreativos, ocasionó 16 muertes. Los casos de MAP, que ocurrieron a lo largo de un periodo de tres años (1962-1965), fueron diagnosticados de manera retrospectiva.

En una investigación posterior de la fuente de las infecciones, se demostró que un falso plafón fracturado creó una cavidad con de agua de la alberca, donde las amebas quedaban capturadas a una temperatura de 27 a 30°C, protegidas de las concentraciones de desinfectante utilizadas (Kadlec et al., 1980). Cuando el nivel del agua fue elevado para las competencias de natación, las amebas y la materia orgánica fueron extraídas de la parte posterior de la pared hacia la alberca. A un lado de la alberca había una zona de jardín, donde los paseantes podían caminar, llevando en sus pies porciones de suelo y amebas que eran introducidas a la alberca (Cerva, 1971). El nivel de cloro libre en la alberca (0.3 mg/l) era inadecuado para matar a las amebas. Para prevenir efectivamente el crecimiento de *Naegleria*, la concentración de cloro libre debe ser de 1 mg/ml (Esterman et al., 1984).

V. Epidemiología

Naegleria, ha sido aislada de la mucosa nasal de niños sanos y asintomáticos (Lawande et al., 1979; Ugonabo and Gugnani, 1989), y de los pasajes nasales de pacientes con MAP. En general, la mayoría de los casos de MAP ocasionados por *N. fowleri* son adquiridos en actividades recreativas en aguas dulces que contienen a estos organismos. Algunas excepciones han sido los baños individuales en aguas termales, o en las actividades de lavado en aguas que contienen amebas. Las personas que contraen la infección son niños y adultos jóvenes, con salud aparentemente buena, y con un historial de haberse bañado o de haber nadado en aguas dulces. La infección se da a través de la mucosa nasa, por la ameba trófica o por el quiste. Este último da lugar a la ameba trófica. Por otro lado, también se ha demostrado que el estadio flagelado (Fig. 2) no es efectivo en el modelo del ratón (Singh and Das, 1972).

Las explicaciones plausibles para la incidencia de MAP en jóvenes, más que en otros grupos de edad, se refieren a que es posible que ellos permanecen en el agua por periodos de tiempo más largos, son más activos y más susceptibles a bucear y a nadar bajo el agua, probablemente agitando los sedimentos del fondo que podrían contener a las amebas. Cualquier acción que obligue a que el agua entre en las fosas nasales incrementaría las probabilidades de una invasión amebiana.

En una reciente selección de casos de MAP de Estados Unidos y México, para realizar análisis de ADN, los hombres (12) superaron en número a las mujeres (1), sugiriendo que es más probable que los hombres tengan una conducta bulliciosa cuando están en el agua, con mayor probabilidad de adquirir la infección (Zhou et al., 2003). Es más probable que los casos registrados en Estados Unidos se hayan desarrollado en la parte más cálida, al sur del país. Al investigar el historial de un caso fatal reciente de MAP (Georgia, EU), en un niño de un grupo de 15 que había estado nadando en un río (temperatura del agua de 33°C), el niño había pasado >2 h en el agua, y había estado buceando, nadando y jugando bruscamente (McKee et al., 2003). También en Estados Unidos, el agua no clorada de un acuífero profundo (Arizona), fue la fuente de las amebas que ocasionaron la MAP en dos niños, probablemente como resultado de haber jugado en una piscina (Anonymous, 2002; Okuda et al., 2004). Se registraron casos de MAP en Florida, después de haber nadado en

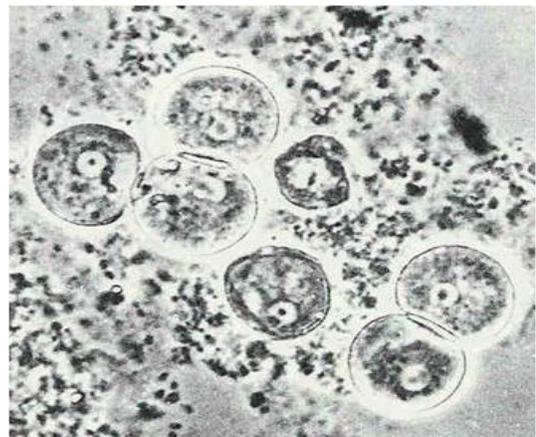
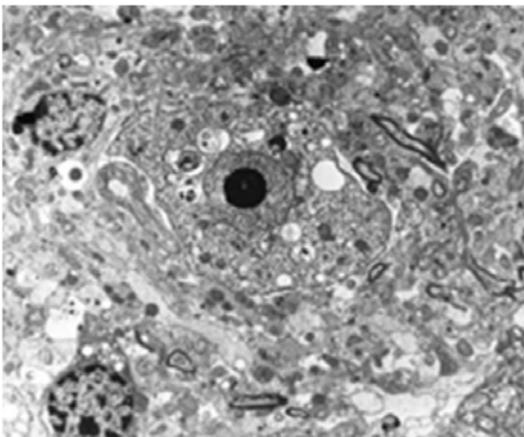
las aguas tibias de un lago. Los mismos lagos, sin embargo, han sido visitados por millones de bañistas, de los cuales sólo una pequeña fracción ha desarrollado MAP. El riesgo de infección ha sido estimado en un caso por cada 2.6 millones de exposiciones (Wellings, 1977). Las *Naeglerias* patógenas fueron aisladas de 41% de 26 lagos muestreados en la Florida, donde los aislados dependieron de la época del año, y donde las muestras se tomaron de la columna de agua o de los sedimentos del fondo (Wellings et al., 1977). El riesgo máximo de MAP para los bañistas en Francia, calculado a través de modelado matemático, fue de 8.5×10^{-8} , en aguas que contenían 10 amebas *N. fowleri* /l, con un incremento en el riesgo ($\sim 10^{-6}$ para 1000 amebas/l), a medida que los números de amebas crecían (Cabanes et al., 2001). En Nueva Zelanda, los casos están asociados con la natación en embalses geotérmicos, y a los bañistas se les advierte que eviten bucear y sumergir sus caras en el agua. Sin embargo, es probable que un caso de MAP reciente, en un niño, se debiera a una de esas inmersiones (Cursons et al., 2003). En el sur de Australia, el agua corriente doméstica, que se lleva a través de tuberías superficiales que recorren grandes distancias, donde es calentada por el sol hasta 35-45°C, fue una fuente importante de infecciones, principalmente durante los meses de verano (Dorsch et al., 1983). Con una cloración efectiva, y con el monitoreo del abastecimiento de agua, los casos de enfermedades ocasionadas por *Naegleria* durante el lavado han desaparecido virtualmente. No se conoce ningún caso de MAP que se haya desarrollado por beber agua con amebas.

La MAP ha sido reportada en otras especies animales, incluyendo bovinos y hasta un tapir. El modelo del ratón se utiliza tanto para estudiar el curso de la enfermedad, como para evaluar la virulencia de los aislados en cultivo (Martinez et al., 1973; Jarolim et al., 2000). Es probable que los especímenes clínicos aislados recientemente muestren un alto grado de virulencia, pero ésta tiende a disminuir con el cultivo continuo in vitro (Wong et al., 1977). La virulencia puede ser regulada por inoculación intranasal en ratones, y el re-aislamiento de las amebas; o con el paso en serie de las amebas en cultivos de tejidos (Wong et al., 1977; John and John, 1989). Los diferentes aislados de *N. fowleri* exhiben distintos niveles de virulencia, como puede ser demostrado por su capacidad para producir un efecto citopático en cultivos de tejido o la muerte de ratones (John and John, 1989). Incluso la ameba no patógena *N. gruberi* puede producir citopatogenicidad en cultivos de tejido si es incubada a 30°C (Marciano-Cabral and Bradley, 1982).

Hasta el momento no se han encontrado endosimbiontes en aislados ambientales y/o clínicos de *Naegleria spp.* *Naegleria fowleri* puede soportar el crecimiento de *L. pneumophila* in vitro, pero sólo en condiciones específicas de cultivo; las amebas suspendidas en solución salina no soportan la proliferación bacteriana, como lo hacen las amebas en medio de cultivo (Newsome et al., 1985).

VI. Meningoencefalitis Amebiana Primaria

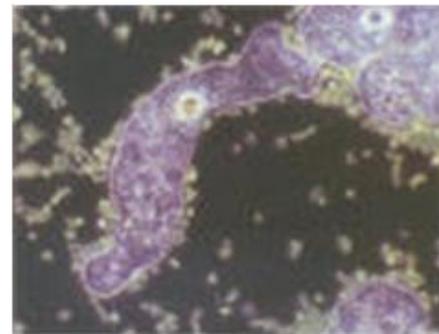
Una vez que penetra en las fosas nasales de los bañistas y otras personas que practican actividades acuáticas, *N. fowleri* penetra la capa epitelial mucosa y migra a través de los tractos del nervio olfativo, cruzando la placa cribiforme, hasta el cerebro. En los niños, la placa cribiforme es más porosa que en los adultos, otra razón potencial para la mayor incidencia de MAP en jóvenes. Debido a su proximidad con el punto de entrada de las amebas en el SNC, los lóbulos frontal y olfatorio del cerebro, son los blancos principales de la destrucción amebiana. Otras áreas afectadas son la base del cerebro, el tallo cerebral y el cerebelo (Martinez, 1985). Las amebas se encuentran en grandes números en las regiones perivasculares en el tejido cerebral (Fig. 5, 6 y 7). Es posible encontrar un exudado purulento que contiene amebas tróficas en el espacio sub-aracnoideo de las meninges. La aparición de los síntomas se da pocos días después de la exposición, e incluye grave dolor de cabeza, náusea y vómito, fiebre (38.5 a 41°C), y anomalías conductuales (Martinez, 1985).



Micrografías de *N. fowleri* en cerebro, Dra. Leonor Pocatererra Ayala. Cátedra de Parasitología



www.cdfound.to.it/HTML/37saygi.htm



www.udel.edu/medtech/dlehman/medt372/N-fowleri.html

El diagnóstico rápido se hace a través de un examen microscópico, de preferencia con contraste de fases, o con fluido cerebroespinal recién extraído, para visualizar a las amebas móviles. Las amebas suspendidas en 1 ml de agua destilada pueden confirmar su identidad como *Naegleria*, buscando el desarrollo de activos nadadores flagelados (Visvesvara, 1999). Es posible obtener una corroboración adicional aislando a la ameba (del fluido cerebroespinal o del tejido cerebral macerado), en una placa de agar no nutritivo que haya sido cubierto con una capa de *E. coli*, e incubado durante toda la noche a 37°C. Las amebas crecerán en grandes números, alimentándose de las bacterias. Dado que ésta es una enfermedad aguda, la diagnosis temprana es esencial para poder iniciar la terapia antimicrobiana adecuada, antes de que las amebas hagan un daño de gran amplitud. El diagnóstico puede retardarse cuando las amebas en el fluido cerebroespinal son confundidas con leucocitos. El patrón de locomoción es claramente diferente: los leucocitos son de movimientos lentos, mientras que las amebas *Naegleria* se mueven relativamente rápido, con sus característicos pseudópodos ectoplásmicos. Los reportes de tres casos de MAP dieron cuentas de amebas en fluido cerebroespinal que fluctuaban entre 26 y 118 amebas/mm³, en comparación con los 330 a >9000 leucocitos/mm³ (Duma et al., 1971).

Existen unos cuantos casos de infecciones que se desarrollaron en personas inmunocomprometidas o con mala salud. Desde la época de la Segunda Guerra Mundial, un prisionero de guerra japonés, mal nutrido y debilitado por las enfermedades, fue diagnosticado con una infección de *I. butschlii* durante la autopsia (Derrick, 1948), pero muchos años después, mediante la tinción con inmunofluorescencia, se confirmó que su muerte se debía a *N. fowleri* (McMillan, 1977). Probablemente debido a su debilitada condición, la infección se había diseminado hasta incluir el cerebro (lesiones hemorrágicas y necróticas), estómago (úlceras), tracto intestinal, nódulos linfáticos mesentéricos y ambos pulmones. Un paciente con lupus sistémico eritematoso, sin historial en la natación, fue diagnosticado post-mortem con MAP (Shrestha et al., 2003).

VII. Tratamiento antimicrobiano.

Los sobrevivientes de MAP son relativamente pocos, probablemente no más de una docena reportada de un estimado de 200 casos. *Naegleria spp.* es sumamente sensible a la droga antifúngica anfotericina B (AmB), que ha sido utilizada virtualmente en todos los casos como anti-microbiano base en donde el paciente se ha recuperado. Se ha determinado que las concentraciones amebicidas mínimas de la AmB son de 0.02-0.078 µg/ml para tres diferentes aislados clínicos de *N. fowleri* probadas in vitro (Duma et al., 1971). Muchas otras cepas probadas mostraron niveles amebicidas de droga igualmente bajos, aunque no necesariamente idénticos. El examen ultra-estructural de las amebas tratadas con AmB reveló distorsiones en la membrana, incluyendo la cubierta nuclear, el retículo endoplásmico liso y rugoso, y el ampolamiento de la membrana plasmática (Schuster and Rechthand, 1975).

El caso mejor descrito y validado de un tratamiento exitoso de MAP es el de una niña de 9 años que fue diagnosticada en las etapas tempranas de la enfermedad, y fue tratada con AmB intravenosa (IV) e intratecal (IT), miconazol IV e IT, y rifampina oral (Seidel et al., 1982). La paciente sobrevivió con secuelas neurológicas mínimas. Las variables que determinan la supervivencia en casos de MAP, son la prontitud con la que se realiza el diagnóstico y se inicia el tratamiento, la dosis de amebas infecciosas, la virulencia de la cepa y la salud del paciente. Es interesante señalar que la cepa de *N. fowleri* aislada de esta paciente pareció ser menos virulenta que otros aislados clínicos, cuando su citopatogenicidad fue probada en cultivos de riñón de mono (John and John, 1989).

Una desventaja en el uso de la AmB es su potencial nefrotóxico, esto ha estimulado la búsqueda de formas menos tóxicas de la droga, para ser utilizadas en el tratamiento. El éster metílico de AmB es una de las formas menos tóxicas del compuesto, pero es menos efectiva en el tratamiento en el modelo de ratón para MAP (Ferrante, 1982). De manera similar, se encontró que la AmB liposomal es inferior al compuesto madre en el modelo de ratón y en las pruebas in vitro (Goswick and Brenner, 2003b).

El antibiótico macrolida azitromicina es efectivo contra *Naegleria* in vitro y en el modelo del ratón, pero se ha reportado que su penetración en el fluido cerebroespinal es deficiente (Schuster et al., 2001; Goswick and Brenner, 2003a). Otros anti-microbianos que han sido

probados, principalmente in vitro, son clotrimazol, itraconazol, fluconazol, y quetoconazol, con distintos grados de eficacia. Las diferencias reportadas en la sensibilidad a la droga se deben al uso de diferentes cepas de *N. fowleri* en diferentes laboratorios, que muestran variación a las drogas. Sin embargo, la AmB, sigue siendo la mejor opción para el tratamiento de la MAP.

VIII. Inmunidad

Las amebas *Naegleria* están entre los protozoarios a los que los humanos están expuestos a lo largo de sus vidas, ya sea a través de contacto directo con el suelo o el agua, o de los quistes transportados por el viento que podrían alojarse en la mucosa nasal. En un estudio de grupos selectos en Checoslovaquia (estudiantes, pacientes siquiátricos), referido anteriormente, los porcentajes de individuos que dieron respuestas de anticuerpos positivas a *Naegleria* fluctuaron entre ~1 a ~4% (Cerva, 1989). Con base en estos bajos porcentajes de anticuerpos, la conclusión es que es poco probable que una forma de la enfermedad, subaguda o asintomática, ocurra en seres humanos. Porcentajes mucho más grandes de respuestas positivas (>80%), fueron encontradas en muestras de suero de pacientes hospitalizados en Estados Unidos (Tennessee), donde anticuerpos de las clases IgG y IgM fueron detectados para *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, que no es patógeno. Los tituladores fluctuaron de 1:20 a 1:640. Los anticuerpos IgG, pero no los IgM, fueron detectados en suero de niños recién nacidos, sustentando la evidencia de la transferencia placentaria cruzada (Dubray et al., 1987). Una diferencia regional fue observada en un estudio que comparó la capacidad aglutinante del suero en los humanos que viven en Pennsylvania (noreste de EU), con la de aquellos que habitan en Carolina del Norte (sureste de EU), para *Naegleria* spp., incluyendo a *N. fowleri* (Marciano-Cabral et al., 1987). El suero del área sureste tuvo una capacidad aglutinante significativamente mayor, atribuible a los anticuerpos IgM que la del estado del norte, sugiriendo que había un mayor grado de exposición a *N. fowleri* en las personas provenientes de la región sureña, que es más cálida. Tituladores de anticuerpos de *Naegleria fowleri* de 1:5-1:20 fueron detectados en muestras de suero de un estudio de Nueva Zelanda, incluyendo IgGs en cordón umbilical (Cursons et al., 1980). Las diferencias que se observan en estos estudios podrían estar en función de las técnicas utilizadas para demostrar los tituladores de los anticuerpos (e. g. hemaglutinación indirecta, técnica avidina-biotina de la peroxidasa del rábano). En forma considerable, todas muestran evidencia de una respuesta humoral a *Naegleria* en el medio ambiente. El suero humano normal, pero no el suero inactivado por el calor, estimula la producción de quinasas de proteína en *N. fowleri*, que podrían ser efectivas para destruir el complemento y proteger a las amebas del complejo de ataque a las membranas de la cascada del complemento (Chu et al., 2000).

Se encontraron anticuerpos contra *Naegleria* en una gran variedad de animales silvestres (Tennessee), incluyendo mapaches, algunos roedores y zarigüeyas, que reflejaban la presencia de anticuerpos contra *Naegleria* en poblaciones humanas (Kollars and Wilhelm, 1996). El suero obtenido de animales silvestres (Oklahoma) mostró actividad lítica atribuible al complemento, dado que el tratamiento con calor destruyó la actividad amebicida (John and Smith, 1997). De las diversas especies probadas, la actividad amebicida fue más fuerte en el suero de mapache, rata almizclera y rana toro, todas ellas especies estrechamente asociadas con los medios acuáticos. Dada la cercana asociación de los animales silvestres con el suelo y el agua, no es sorprendente que se encuentren agentes protección inmunológica.

¿Qué sucede a nivel inmunológico en la MAP aguda? Debido a que es una enfermedad fulminante, a menudo fatal en una o dos semanas, no hay tiempo suficiente para que el sistema inmune estructure una respuesta efectiva contra las amebas. En el caso de un sobreviviente de MAP, descrito en la Sección 3.5, una respuesta de anticuerpos fue detectada a los 10 días, alcanzando una titulación final de 1:4096 (Seidel et al., 1982). En comparación, el padre del paciente que no mostró ninguna evidencia de infección, tuvo un título de 1:16, y la madre fue negativa para el anticuerpo.

La tinción con inmunofluorescencia para el anticuerpo de *Naegleria* en pacientes de MAP no es muy efectiva como herramienta de diagnóstico. La razón, desde luego, es que no hay tiempo suficiente para que ocurra una reacción de los anticuerpos humorales. Existen diferencias en los anticuerpos superficiales entre *Naegleria spp. Naegleria fowleri* y *N. lovaniensis* comparten antígenos similares entre ellas (Marciano-Cabral et al., 1987), pero no los comparten con *N. australiensis* y *N. gruberi*, que no es patógena. Además, no existe reactividad serológica cruzada con los antígenos superficiales de *Acanthamoeba* o *Balamuthia*.

IX. Diagnóstico Molecular

El número de especies de *Naegleria* ha escalado desde una (*N. gruberi*), en la literatura pre-MAP, a cinco (Page, 1988), a 11 (De Jonckheere, 1998), a 27 (De Jonckheere, 2002), al número actual de cerca de 30 (De Jonckheere, 2004), con muchas otras por venir. Mientras la diferenciación temprana entre las especies se basaba en propiedades fisiológicas (temperatura, tolerancia, patogenicidad, capacidad para generar flagelados, etc.), de los aislados de *Naegleria*, las diferencias actuales entre especies y cepas se basan en los análisis moleculares de los pequeños genes de las sub-unidades del rRNA, dando como resultado el actual aumento en las descripciones de las especies. El foco de esta sección estará en el trabajo realizado en la especie patógena *N. fowleri*, y sólo tocará de lado a las especies no patógenas. Es posible encontrar evaluaciones más extensas de las relaciones filogenéticas entre *Naegleria* spp., en las referencias citadas (Pélandakis et al., 2000; De Jonckheere, 2002, 2004; Zhou et al., 2003).

El diagnóstico de las infecciones de *Naegleria* presenta menos problemas que el de las infecciones de *Acanthamoeba*. Una sola especie está involucrada en todas las infecciones humanas, con frecuencia, nadar en aguas dulces es el común denominador en todos los casos, y la enfermedad tiene un curso distintivo, desafortunadamente a menudo reconocido sólo en retrospectiva. Se han hecho pocos esfuerzos en la metodología molecular para propósitos de diagnóstico, pero el trabajo se ha concentrado en:

- (i) las diferencias entre *Naegleria* spp. y *N. fowleri*;
- (ii) diferencias entre las cepas de los aislados de *N. fowleri*;
- (iii) los métodos para detectar amebas en aguas recreativas; y
- (iv) los análisis epidemiológicos para rastrear infecciones desde la fuente ambiental hasta el paciente

La aplicación temprana de la metodología PCR era para la amplificación específica del DNA de *N. fowleri* para identificar a la ameba en muestras ambientales (Sparagano, 1993a; Kilvington and Beeching, 1995a). El método era suficientemente sensible como para detectar una sola ameba, y también podía detectar quistes (Sparagano, 1993b; Kilvington

and Beeching, 1995a).

Una sonda especie-específica fue diseñada a partir del cDNA para ser utilizado en un ensayo PCR anidado, ofreciendo mayor sensibilidad para la detección directa de *N. fowleri* en muestras de agua (Réveiller et al., 2002). La técnica no requiere el cultivo de las amebas ni la extracción del ADN, y era lo suficientemente sensible como para detectar 5 pg (cinco amebas tróficas) de DNA genómico de *N. fowleri* en muestras acondicionadas.

Una reciente aplicación de la metodología PCR ha sido en la corroboración de la identificación en laboratorio de *Naegleria* spp., basada en la respuesta a la flagelación de las amebas tróficas. La prueba de la flagelación se emplea con frecuencia como prueba confirmatoria para el reconocimiento de *Naegleria* spp. en el ambiente, o para identificar aislados amebianos clínicos como *N. fowleri*. Sin embargo, algunos aislados, flagelan deficientemente en condiciones de laboratorio y, en ausencia de flagelados, pueden ser mal identificados.

Las pruebas PCR y ELISA se utilizaron para examinar miembros de *Naegleria* spp. que no flagelaron al ser sometidos a la prueba de flagelación (Behets et al., 2003). De 28 aislados amebianos que no flagelaron, 11 se confirmaron como *Naegleria* spp a través de PCR no específicas, y seis como *N. fowleri* a través de una combinación de PCRs y ELISAs especie-específicas (Behets et al., 2003).

La heterogeneidad genética de las cepas de *N. fowleri* fue documentada con un análisis RFLP de todo el DNA celular (De Jonckheere, 1987; McLaughlin et al., 1988). El examen de una combinación de perfiles de isoenzima y análisis RFLP de aislados de *N. fowleri* geográficamente diversas, llevó al reconocimiento de grupos de cepas de Australia y de Europa, y a la presencia de ambos grupos genotípicos en Estados Unidos (De Jonckheere, 1988). Las poblaciones de *Naegleria fowleri* en Estados Unidos fueron postuladas como la fuente de los otros dos grupos que se dispersaron a escala global al este y al oeste, a Europa y a Oceanía (Australia/Nueva Zelanda), respectivamente. En otro estudio, en análisis RFLP confirmó la heterogeneidad genotípica entre cepas de *N. fowleri*, conduciendo al reconocimiento de tres grupos: Europeo, Oceánico y Americano (EU) (Kilvington and Beeching, 1997). Los análisis también mostraron que las variedades continentales no estaban claramente delineadas; existían variaciones dentro de las poblaciones de áreas geográficas discretas (e.g., entre los aislados europeos). La posterior confirmación de las

diferencias varietales entre los aislados de *N. fowleri* se obtuvo a partir de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), que también confirmó que diferentes variantes genotípicas estaban presentes en la misma región geográfica general, y que cepas de regiones ampliamente separadas eran genotípicamente idénticas (Pélandakis et al., 1998). Como ejemplo de esta diversidad, un aislado francés (Cattenom) era idéntico a una cepa de Japón, mientras que otro aislado francés (Chooz) se parecía a las cepas del Pacífico del Sur; un tercero (Golfech) fue similar a las variantes de México, y un cuarto (St Laurent), fue similar a las cepas de Estados Unidos y México.

La secuenciación del gen rRNA 5.8S y los espaciadores internos 1 y 2 transcritos (ITS1 y ITS2) de *N. fowleri* ha demostrado que la región genómica puede ser utilizada para diferenciar las cepas (De Jonckheere, 1998; Pélandakis et al., 2000; Zhou et al., 2003). El ITS1 de diferentes aislados de *N. fowleri* muestra las variaciones en secuencia y longitud (42-142 bp de largo), mientras que el ITS2 (106 bp de largo) y el gen rRNA 5.8S (175 bp de largo) sólo mostraron variaciones en la secuencia (De Jonckheere, 1998, 2004; Pélandakis et al., 2000).

La variedad en la longitud del ITS 1 está en función del número de repeticiones de los motivos 1 y 2 en el ITS 1 (De Jonckheere, 1998; Pélandakis et al., 2000). Se diseñaron dos cebadores especie específicos complementarios para las regiones terminales variables del ITS1 y ITS2, haciendo posible distinguir a *N. fowleri* de otras especies de *Naegleria* (Pélandakis et al., 2000). Al aplicar un análisis filogenético de las especies, se reconocieron dos grandes grupos de amebas *N. fowleri*. Un grupo (genotipo IV, de acuerdo con Zhou et al., 2003), estuvo integrado por aislados de Francia y del Pacífico del Sur; el segundo grupo (genotipo III), incluyó aislados de Europa y América (incluyendo los aislados "Widespread" (difundidos) de Francia y Hong Kong) (Pélandakis et al., 2000). Un estudio de aislados de *N. fowleri* de Estados Unidos y México confirmó la presencia de dos grandes grupos de cepas de *N. fowleri*: el grupo europeo-americano (genotipo III de Zhou et al., 2003), y representantes del grupo Widespread (genotipo I). Un tercer grupo (genotipo II, restringido hasta el momento sólo a América), también fue descrito, apoyando la hipótesis de De Jonckheere (2002), de que algunas cepas de *N. fowleri* están geográficamente segregadas (Zhou et al., 2003). Los árboles filogenéticos, ya sea que estén basados en el rRNA de las pequeñas sub-unidades mitocondriales o en el ITS 1 y 2 de las cepas de *N.*

fowleri, dieron resultados consistentes con respecto a la asignación de las cepas a genotipos diferentes (I-III) (Zhou et al., 2003). Ahora se sabe que existen seis genotipos de *N. fowleri*, basados en el número y tipo de repeticiones del ITS (Zhou et al., 2003).

La caracterización molecular de las cepas también es útil para rastrear las infecciones hasta una fuente y reconocer los riesgos potenciales para nadadores o bañistas en localidades particulares. Se diseñó una sonda de ADN especie-específica para identificar a *N. fowleri* en muestras ambientales, seguidas por análisis RFLP del DNA de la célula completa para hacer la confirmación (Kilvington and Beeching, 1995b). La determinación (typing) epidemiológica de *N. fowleri* fue utilizada en el análisis del gen rRNA 5.8S y el ITS de aislados clínicos (Zhou et al., 2003). Dos personas que habían visitado las mismas aguas termales en California, en momentos diferentes, desarrollaron MAP. Los aislados de amebas del fluido cerebroespinal de los pacientes fueron del mismo genotipo (II) y, a su vez, fueron diferentes a los genotipos de otras cepas de *N. fowleri* examinadas.

X. Referencias

- Abraham**, S.N., Lawande, R.V., 1982. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria. *J. Trop. Med. Hyg.* 85, 217-222.
- Amaral Zettler**, L.A., Nerad, T.A., O'Kelly, C.J., Peglar, M.T., Gillevet, P.M., Silberman, J.D., Sogin, M.L., 2000. A molecular reassessment of the leptomyxid amoebae. *Protist* 151, 275-282.
- (**Anonymous**, 2002. *Naegleria* deaths in Arizona. Health Stream Article. <http://www.waterquality.crc.org.au/hsarch/HS28c.htm>; Okuda et al., 2004)
- Badenoch**, P.R., Grimmond, T.R., Cadwgan, J., Deayton, S.E., Essery, M.S.L., Hill, B.D., 1988. Nasal carriage of free-living amoebae. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 1, 209-211.
- Behets**, J., Seghi, F., Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A., Ollevier, F., 2003. Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Sci. Technol.* 47, 117-122.
- Booton**, G.C., Carmichael, J.R., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Fuerst, P.A., 2003a. Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 65-69.
- Brown**, T., 1979. Observations by immunofluorescence microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *J. Med. Microbiol.* 12, 363-371.
- Cabanes**, P.-A., Wallet, F., Pringuez, E., Pernin, P., 2001. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2927-2931.
- Cerva**, L., 1989. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol.* 33, 99-103.
- Chu**, D.-M.T., Ferguson, T.J., Marciano-Cabral, F., 2000. Protein kinase activation and protein phosphorylation in *Naegleria fowleri* amoebae in response to normal human serum. *J. Euk. Microbiol.* 47, 40-47.
- Cursons**, R., Sleight, J., Hood, D., Pullon, D., 2003. A case of primary amoebic meningoencephalitis: North Island, New Zealand. *N.Z. Med. J.* 116, 1187.
- De Jonckheere**, J.F., 2002. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* 41, 309-342.
- De Jonckheere**, J.F., 2004. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist* 155, 89-103.
- De Jonckheere**, J., Michel, R., 1988. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.* 74, 314-316.
- Derrick**, E.H., 1948. A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoon closely resembling, if not identical with, *Iodamoeba bütschlii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 42, 191-198.
- Dorsch**, M.M., Cameron, A.S., Robinson, B.S., 1983. The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 372-377.
- Dubray**, B.L., Wilhelm, W.E., Jennings, B.R., 1987. Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* from a hospital survey. *J. Protozool.* 34, 322-327.
- Duma**, R.J., Rosenblum, W.I., McGehee, R.F., Jones, M.M., Nelson, E.C., 1971. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to

amphotericin B, and a review. *Ann. Int. Med.* 74, 923-931.

Eisen, D., Franson, R.C., 1987. Acid-active neuraminidases in growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit alveolar macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 369-372.

Esterman, A., Roder, D.M., Cameron, A.S., Robinson, B.S., Walters, R.P., Lake, J.A., Christy, P.E., 1984. Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 325-328.

Ferrante, A., 1982. Comparative sensitivity of *Naegleria fowleri* to amphotericin B and amphotericin B methyl ester. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 476-478.

Fowler, M., Carter, R.F., 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: a preliminary report. *Br. Med. J.* 2, 740-743.

Goswick, S.M., Brenner, G.M., 2003a. Activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 524-528.

Griffin, J.L., 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty hypothesis. *J. Protozool.* 30, 403-409.

Jarolim, K.L., McCosh, J.K., Howard, M.J., John, D.T., 2000. A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. *J. Parasitol.* 86, 50-55.

John, D.T., Howard, M.J., 1996. Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic free-living amebae. *Folia Protistol.* 43, 267-271.

John, D.T., Cole Jr., T.B., Bruner, R.A., 1985. Amebostomes of *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 32, 12-19.

Kadlec, V., Skvarova, J., Cerva, L., Nebázniva, D., 1980. Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitolog. (Praha)* 27, 11-17.

Kilvington, S., Beeching, J., 1995a. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3764-3767.

Kollars Jr., T.M., Wilhelm, W.E., 1996. The occurrence of antibodies to *Naegleria* species in wild mammals. *J. Parasitol.* 82, 73-77.

Lares-Villa, F., De Jonckheere, J.F., De Moura, H., Recchi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C., Visvesvara, G.S., 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* 31, 685-688.

Lawande, R.V., Abraham, S.N., John, I., Egler, L.J., 1979. Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan period in Zaria. *Am. J. Clin. Pathol.* 71, 201-203.

Lugg, R., Psaila-Savona, P., 2001. A legal standard for thermophilic *Naegleria* in a freshwater body in Western Australia, in: Billot-Bonef, S., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P., Pringuez, E. (Eds.), IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, Proceedings. John Libbey Eurotext, Paris, France, pp. 291-298.

Marciano-Cabral, F., Bradley, S.G., 1982. Cytopathogenicity of *Naegleria gruberi* for rat neuroblastoma cell cultures. *Infect. Immun.* 35, 1139-1141.

Marciano-Cabral, F., Cline, M.L., Bradley, S.G., 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 692-697.

- Martinez, A.J.**, 1980. Is Acanthamoeba encephalitis an opportunistic infection?. *Neurology* 30, 567-574.
- Martinez, A.J.**, 1985. Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. CRC Press, Boca Raton, Florida. 156 pp.
- McKee, T.**, Davis, L., Blake, P., Kreckman, L., Bialek, S., Visvesvara, G., McGuire, J.H., Fox, L., Amann, J., 2003. Primary amebic meningoencephalitis—Georgia, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 52, 962-964.
- McLaughlin, G.L.**, Brandt, F.H., Visvesvara, G.S., 1988. Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected Naegleria and Acanthamoeba amoebae. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1655-1658.
- McMillan, B.**, 1977. Diagnostic review of Derrick's case of generalized amoebiasis (? Iodamoeba bütschlii). *Pathology* 9, 76.
- Michel, R.**, Röhl, R., Schneider, H., 1982. Isolation of free-living amoebae from nasal mucosa of healthy individuals. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 176, 155-159.
- Newsome, A.L.**, Baker, R.L., Miller, R.D., Arnold, R.R., 1985. Interactions between Naegleria fowleri and Legionella pneumophila. *Infect. Immun.* 50, 449-452.
- Okuda, D.T.**, Hanna, H.J., Coons, S.W., Bodensteiner, J.B., 2004. Naegleria fowleri hemorrhagic meningoencephalitis: report of two fatalities in children. *J. Child Neurol.* 19, 231-233.
- Page, F.C.**, 1974. Rosculus ithacus Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellidae) and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozool.* 13, 143-154.
- Pélandakis, M.**, Serre, S., Pernin, P., 2000. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in Naegleria spp. and in N. fowleri. *J. Euk. Microbiol.* 47, 116-121.
- Pussard, M.**, Pons, R., 1979. Étude des pores kystiques de Naegleria (Vahlkampfiidae-Amoebida). *Protistologica* 15, 163-175.
- Réveiller, F.**, Cabanes, P.-A., Marciano-Cabral, F., 2002. Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba Naegleria fowleri. *Parasitol. Res.* 88, 443-450.
- Rivera, F.**, Rosas, I., Castillo, M., Chávez, R., Gómez, R., Ch'ío, R.E., Islas, J., 1986. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environ. Res.* 39, 364-371.
- Schuster, F.L.**, 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 342-354.
- Schuster, F.L.**, Rechthand, E., 1975. In vitro effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates Naegleria gruberi and Naegleria fowleri. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 591-605.
- Schuster, F.L.**, Dunnebacke, T.H., Visvesvara, G.S., 2001. Activity of selected antimicrobials against clinical isolates of pathogenic free-living amebas, in: Billot-Bonafant, S., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P., Pringuez, E. (Eds.), IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, Proceedings. John Libbey Eurotext, Paris, France, pp. 45-48.
- Seidel, J.S.**, Harmatz, P., Visvesvara, G.S., Cohen, A., Edwards, J., Turner, J., 1982. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* 306, 346-348.
- Singh, B.N.**, Das, S.R., 1972. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of Naegleria aerobia and its bearing on the epidemiology of human meningoencephalitis.

