



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala Biología

Proyecto de Conservación y Mejoramiento del
Ambiente

Laboratorio de Microbiología Ambiental

Identificación de *Naegleria sp.* De una Piscina de Aguas Termales de Hidalgo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

DIEGO ARTURO CASTILLO RAMIREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

MEXICO D.F. – JUNIO 2015



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.

Índice

Índice.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	IV
1.1 Taxonomía.....	V
2. ANTECEDENTES.....	VI
2.1 Antecedentes en México.....	VIII
3. JUSTIFICACIÓN.....	X
4. OBJETIVOS.....	X
4.1 Generales.....	X
4.2 Particulares.....	XI
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	XI
5.1 Cultivo Axénico.....	XI
5.2 Identificación Morfológica.....	XII
5.2.1 Fase de Trofozoíto.....	XII
5.2.2 Fase de Quiste.....	XII
5.2.3 Fase Flagelar.....	XII
5.3 Tolerancia de Temperatura.....	XIII
5.4 Prueba de Patogenicidad.....	XIII
6.5 Extracción De ARN.....	XIII
6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa – Retro transcripción (RT-PCR) ..	XIV
6.7 Secuenciación.....	XVI
6. RESULTADOS.....	XVII
6.1 Trofozoíto.....	XVII
6.2 Quiste.....	XVII
6.3 Flagelación.....	XVIII

6.4	<i>Prueba de Patogenicidad y Temperatura</i>	XVIII
6.5	<i>RT-PCR</i>	XIX
6.6	<i>Secuenciación</i>	XX
6.6.1	<i>Alineamiento</i>	21
7.	<i>DISCUSIÓN</i>	XXII
8.	<i>CONCLUSIONES</i>	XXV
9.	<i>LITERATURA CITADA</i>	XXVI
	<i>ANEXO</i>	XXXI

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 10 años ha habido un incremento en las enfermedades infecciosas alrededor del mundo, esto puede ser una respuesta al crecimiento de la población mundial, el aumento del hambre y pobreza entre otros factores como la contaminación y el exceso de materia orgánica. Uno de los grupos de microorganismos que ha demostrado tener importancia en la salud pública son las amibas de vida de libre (AVL).

Las amibas de vida libre son protozoos que se desarrollan y utilizan como medio de dispersión en ambientes como el agua, suelo y aire (Jonckheere, 2002). Se ha establecido que las amibas de vida libre además de vivir en el ambiente, producen en el hombre enfermedades de curso diverso; desde cuadros agudos y fatales con componentes de predominio necrótico a enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa. Las características de las enfermedades humanas producidas por estas amibas sólo han sido reconocidas durante los últimos 30 años ya que por ejemplo, el número de humanos infectados por amibas de vida libre es bajo en comparación con el número de pacientes afectados por *Entamoeba histolytica*.

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>

Es importante decir que algunas amibas de vida libre son capaces de vivir de dos formas: como parásitos y como organismos de vida libre, a raíz de esto se denominan amibas anfizoicas. (Oddo, 2006)

Las especies de AVL patógenas son; *Naegleria fowleri*, que produce Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP), *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y varias especies del género *Acanthamoeba* spp. causan Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG). *Acanthamoeba* puede provocar infecciones severas en pulmón, oídos, nariz y queratitis amebiana (QA) en ojos y

Acanthamoeba spp. *Balamuthia mandrillaris* pueden causar Amibiasis cutánea. Ciertas amibas también pueden actuar como vectores de ciertas bacterias como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *Vibrio* spp., etc. Algunas son considerados patógenos oportunistas porque pueden producir enfermedades en individuos inmuno-comprometidos (Bonilla *et al.*, 2014).

En la medida que estos agentes son conocidos y sus cuadros clínicos y anatomopatológicos sean familiares, se tienen mayores posibilidades de diagnosticar de manera oportuna y eventualmente tratar las infecciones por amibas de vida libre.

En 1958, Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba* spp., y en 1965 Fowler y Carter reportaron el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) causado por *Naegleria fowleri* en Australia; posteriormente, en la República Checa se identificó, de manera retrospectiva, un brote de 16 casos de MEAP adquirida en una alberca calentada artificialmente. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>)

1.1 Taxonomía

La propuesta más reciente (Adl *et al.*, 2012) ubica al género *Naegleria* como sigue:

- **Supergrupo** Excavata (Adl *et al.*, 2012)
 - . **Clase** Heterolobosea Page & Blanton 1985
 - **Orden** Schizopyrenida Singh, 1952
 - **Familia** Vahlkampfiidae Jollos, 1917
 - **Género** *Naegleria* Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913.

2. ANTECEDENTES

Un estudio retrospectivo de los archivos del Departamento de Patología de Colegio Médico de Virginia, que data de 1920, hecho por el Dr. John G. dos Santos, describió que en todos estos casos el agente causal fue *N. fowleri*, y el primer caso había ocurrido el 15 de julio de 1937 (Oddo, 2006).

Un caso en humanos causado por *Naegleria* fue descrito en Australia en el año de 1965 por Fowler y Carter, el cual correspondió a una meningitis fatal que fue inicialmente atribuida a *Acanthamoeba sp.*, pero después se identificó como *Naegleria*.

En 1966, se describieron en E.U.A. 4 casos de meningoencefalitis en los que se reconocieron parásitos de tipo amebiano, pero en 3 de ellos no fueron plenamente identificados; en el otro se sugirió que una especie de *Acanthamoeba* o *Hartmannella* era responsable de la infección, pero en este caso los protozoos fueron diagnosticados ulteriormente, como *Naegleria fowleri*. En base a los casos descritos, a la enfermedad se le denominó como meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), término que fue acuñado por Cecyl G. Butt (Oddo, 2006).

Ocho casos de meningoencefalitis fulminante en la zona de Richmond, Virginia, fueron comunicados en 1968, siete de los cuales se habían producido durante los veranos de 1951 y 1952 (Callicott, 1968). Varios casos similares de meningoencefalitis fueron también comunicados durante 1968, en otros lugares del mundo, incluido un brote de 16 casos en Praga, Checoslovaquia, que fueron diagnosticados en forma retrospectiva (Cerva *et. al.*, 1968). Seis casos más ocurridos en el sur de Australia fueron publicados por Carter en 1968.

Shin en 2001 menciona que *Naegleria fowleri* expresa algunos genes que pueden ser considerados como factores de virulencia. Por ejemplo el gen Nfa1 está

constituido de 360 pb y codifica para un total de 119 aminoácidos que a su vez codifican para una proteína recombinante de 13.1 kDa, la cual se localiza en los pseudópodos de *Naegleria fowleri*, siendo reportado como específico para *Naegleria fowleri*

En la actualidad, se han identificado 47 especies pertenecientes a este género, muchas de las cuales se han identificado por primera vez, y otras se reclasifican con base en sus secuencias genéticas (De Jonckheere *et al.*, 2001; De Jonckheere, 2002; De Jonckheere, 2004; De Jonckheere *et al.*, 2005; Visvesvara *et al.*, 2005; De Jonckheere, 2006).

Lares y Lares en 2009 identificaron géneros de amibas en aguas superficiales en Sonora, México tomando en cuenta criterios morfológicos y moleculares, de las 91 cepas aisladas, 14 resultaron positivas a la prueba de flagelación. De éstas, 5 crecieron a 45°C y 9 crecieron en un rango de temperatura entre 20°C y 37°C. A 5 cepas sospechosas de ser *Naegleria fowleri*, se les extrajo el ADN y se trataron con la técnica de PCR usando un par de primers; NFFW y NFRV reportados como especie específicos de *Naegleria fowleri*. El resultado mostró que los aislamientos correspondieron a otras especies de *Naegleria* termófilas.

Se sabe que los genes codificantes son una herramienta de conocimiento importante, en 2013, Kim diseñó una posible vacuna a partir del gen Nfa1 contra la infección por *Naegleria fowleri*, se construyó un vector lentiviral que expresaba el gen Nfa1, utilizando ratones BALB/c que fueron vacunados intranasalmente con el vector viral, se midieron niveles de IgG, inducción de citoquinas, gamma interferón y la tasa de sobrevivencia en ratones que desarrollan MEAP. En ratones vacunados se encontró un alto nivel de anticuerpos específicos para Nfa1 hasta doce semanas después de la vacunación. Estos ratones mostraron una tasa de sobrevivencia del 90% aproximadamente al ser retados con trofozoítos de *Naegleria fowleri*.

El caso más reciente se registró en Miami, Florida U.S.A., a finales del 2013. Un niño de 12 años diagnosticado con MEAP, con antecedente de actividades acuáticas, según los reportes se le administró un medicamento experimental diseñado particularmente para tratar el cáncer de pecho, teniendo un resultado exitoso contra las amibas, sin embargo el fallecimiento se debió a la nula actividad cerebral del paciente. El mismo medicamento que se utilizó de manera exitosa para tratar a una niña de 12 años de edad, en Arkansas, Estados Unidos de Norteamérica, después de lo cual se convirtió en la tercera persona sobreviviente en los últimos 50 años. (<http://www.cnn.com/2013/09/11/health/arkansas-amoeba-survivor-home/>), (<http://www.cnn.com/2013/08/22/health/amoeba-case-florida/index.html>).

Entre 2001 y 2010, hubo 32 casos reportados de personas infectadas por *N. fowleri* en los Estados Unidos, de acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. La mayor parte de los casos han sido en el sureste de ese país. (<http://www.cnn.com/2013/08/24/us/brain-eating-parasite-boy-dead/>)

2.1 Antecedentes en México

En México el estudio de estos organismos ha aumentado después de los casos de MEAP reportados por Valenzuela *et al.*, 1984, Rodríguez-Pérez, 1984, López-Corella *et al.*, 1989.

Siete muestras de áreas con agua termal en Tecozautla, Hidalgo fueron analizadas durante diciembre de 1984, la identificación fue realizada bajo parámetros de morfología, isoenzimas y proteínas totales. Varias de las cepas identificadas pertenecen al género *Naegleria*, se identificaron dos cepas patógenas *Naegleria australiensis* y *Naegleria lovaniensis*, además se encontró

Acanthamoeba castellanii y *Acanthamoeba lugdunensis*, se recomendó la vigilancia periódica y cloración a estas áreas recreativas (Rivera *et al.*, 1988).

En 1990, Rivera y cols. analizaron muestras de aguas termales en Michoacán, México y aislaron amibas muy semejantes a la especie *Naegleria lovaniensis*, sin embargo, los resultados mostraron varias diferencias morfofisiológicas y bioquímicas con *N. lovaniensis*, las cuales fueron suficientes para considerar una subespecie nueva y otra variable de *Naegleria lovaniensis*, los nombres propuestos fueron *tarasca* para la subespecie y *purepecha* para la variante morfológica.

En 1993 Rivera *et al.* encontraron amibas de vida libre en albercas y tinas de fisioterapia en México, los aislados se cultivaron en agar no nutritivo combinado con *Escherichia coli*, fueron identificadas morfológicamente usando claves taxonómicas, patrón total de proteínas e isoenzimas. Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en ratones de 3 semanas de vida inoculados por vía intranasal, en donde ninguna de las cepas de *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Glaeseria*, *Filamoeba*, *Vannella*, o *Amoeba* resultaron ser patógenas, los géneros de ocurrencia más frecuente fueron especímenes de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Naegleria*. Este estudio demostró que las concentraciones de cloro usadas no eran las suficientes para eliminar los quistes viables de la mayoría de amibas de vida libre.

Se han reportado otros trabajos en el país donde señalan la presencia de amibas del género *Naegleria* en el ambiente y que no se identificaron hasta nivel de especie (Rivera *et al.*, 1992; Rivera *et al.*, 1994).

La mayoría de casos reportados en México se ubican en la región noroeste del país. El primer caso de MEAP en México se detectó en 1978 en un adolescente de 16 años con antecedentes de actividades acuáticas en canales de agua en Mexicali Baja California. Se encontraron trofozoítos de *N. fowleri* en las meninges

y en secciones cerebrales del paciente. Desde entonces se han diagnosticado 29 casos en México de MEAP en total: 23 en Mexicali, B. C., tres en Sonora; uno en Monterrey, N. L., uno en Huetámo, Michoacán y uno en Tamaulipas , incluyendo un sobreviviente tratado con Anfotericina B, cloranfenicol y sulfadiacina (Lares, 2001; Bonilla *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Las amibas de vida libre son organismos cosmopolitas y se ha demostrado su amplia distribución en aguas naturales y artificiales utilizadas antropológicamente para uso recreativo. El incremento de casos causados por amibas de vida libre, en particular el género *Naegleria* provoca la necesidad de estudiar otras especies del género con potencial patógeno en cuerpos de agua naturales y artificiales, de ahí la importancia de caracterizar por métodos moleculares a las especies de *Naegleria* y de otros géneros en México, ya que entre ese grupo se encuentra la especie *N. fowleri*, capaz de causar la muerte en el hombre, este estudio dará herramientas metodológicas que ayudarán a conocer a las amibas patógenas como no patógenas e implementar posibles medidas de prevención a infecciones causadas por amibas patógenas. De igual manera ayudaran a hacer descripciones morfológicas y moleculares de especies no descritas en México ya sean patógenas o no, así como ampliar el conocimiento en la patogenia y ecología desarrollando técnicas morfológicas y moleculares de manera conjunta.

4. OBJETIVOS

4.1 Generales

- Identificar *Naegleria sp.* aislada de una piscina de aguas termales del estado de Hidalgo.

4.2 Particulares

- Describir morfológicamente a *Naegleria sp.* mediante microscopía óptica.
- Determinar la patogenicidad de la cepa de *Naegleria*
- Realizar la prueba de tolerancia a la temperatura
- Identificar *Naegleria sp.* por RT-PCR
- Determinar la presencia del gen NAE específico para el género *Naegleria*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa de *Naegleria* se aisló del agua de una piscina alimentada por un manantial de aguas termales del centro recreativo Parque EcoAlberto situado en Ixmiquilpan, Estado de Hidalgo, México, en agosto de 2011 (temperatura de 33°C, pH de 7.1, oxígeno disuelto de 3.0 y 0.0 de cloro libre residual) (López, 2014).

5.1 Cultivo Axénico

La amiba en estudio se aisló originalmente en el medio monoaxénico agar no nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes*. Se tomaron cuadros de NNE de 1 cm² y se colocaron en medio Ringer con suero de ternera con antibiótico al 10% de la concentración final del medio, según lo reportado por López (2014).

Para expandir el cultivo se hicieron siembras en tubos con 2.7 ml de medio Ringer, con 0.3 ml de suero de ternera con antibiótico y un inóculo de *Naegleria sp.*, de igual manera en frascos de cultivo de 50 ml con 12 ml de medio Ringer, más 0.12 ml de suero de ternera con antibiótico y un inóculo de *Naegleria sp.*

5.2 Identificación Morfológica

Para la identificación morfológica se observaron las tres fases características del género *Naegleria sp.* (trofozoíto, quiste y fase flagelada). Se realizaron preparaciones *in vivo* de cultivos axénicos y se observaron en microscopio óptico de contraste de fases a un aumento de 10× y 40×. La identificación morfológica se realizó utilizando la clave taxonómica de Page, (1988).

5.2.1 Fase de Trofozoíto

Se hicieron preparaciones *in vivo* del cultivo amibiano en fase de trofozoíto de *Naegleria sp.* y se observaron en un microscopio marca Zeiss 10× y 40×. Se midieron 100 trofozoítos y se identificaron usando las claves taxonómicas de Page (1988).

5.2.2 Fase de Quiste

Se hicieron preparaciones *in vivo* de *Naegleria sp.* en forma de quiste y se observaron en un microscopio marca Zeiss a 10× y 40×. Se midieron 100 organismos, y se registró la presencia y número de poros, posteriormente se identificaron con la clave taxonómica de Page (1988).

5.2.3 Fase Flagelar

A tubos con 2 ml de agua destilada a temperatura ambiente, se les agregó un inóculo del cultivo axénico con abundantes trofozoítos de la cepa amibiana. Posteriormente se inocularon por cuatro horas, revisando cada media hora aproximadamente.

5.3 Tolerancia de Temperatura

Esta prueba consistió en determinar la temperatura óptima de crecimiento de las amibas. Los aislamientos se sembraron por triplicado en medio Ringer (López, 2014) y se incubaron a diferentes temperaturas 25°C, 37°C y 42 °C, se observaron cada 24 horas con un microscopio invertido marca Nikon a 10× durante una semana verificando el desarrollo amibiano.

5.4 Prueba de Patogenicidad

La prueba se realizó en cinco ratones machos, Balb/c de tres semanas de edad a partir de cultivos axénicos (De Jonckheere *et al.*, 1983). Los trofozoítos en crecimiento exponencial, se ajustaron a una cuenta de 1×10^6 por ml y se inocularon por instilación nasal (IN). El volumen inoculado fue de 30 microlitros. Como grupo control, se inocularon cinco ratones con medio de cultivo sin amibas. Los ratones se observaron durante 21 días, registrando los cambios en su comportamiento. Fueron sacrificados una vez cumplidos los 21 días, los órganos blancos (cerebro, riñón, pulmón, hígado) fueron colocados en cajas Petri con agar NNE para recuperar las amibas (Cerva, 1967)

6.5 Extracción De ARN

Las amibas fueron cultivadas en frascos de cultivo de 5 ml, conteniendo medio axénico Ringer, fueron cosechadas en el crecimiento considerado como optimo y por centrifugación (3500 rpm por 15 min) se obtuvo la pastilla celular. La pastilla celular fue almacenada en trizol a una relación de 1 ml de trizol por cada 10 millones de organismos y almacenada a -4°C para posteriormente ser usada para la extracción del ARN total. (Invitrogen, Carlsbad, California).

6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa – Retro transcripción (RT-PCR)

Primero se extrajo el ARN total mediante el uso de Trizol (Invitrogen Life Technologies) donde al concentrado celular, se le agregó 1 ml de Trizol y se homogenizó. Posteriormente 200 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico fue agregado y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos en tubos Eppendorf de 1.5 ml; la fase acuosa fue recuperada en otro tubo, y se le agregó un volumen de 0.5 ml de isopropanol para ser centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. La pastilla resultante fue lavada 5 veces con 500 μ l de etanol al 75%. La pastilla se dejó secar y fue resuspendida en 30 μ l de H₂O bidestilada conteniendo 0.1% de dietilpicrocarbonato, DEPC (10813-012, Invitrogen, Carlsbad, California).

El ARN total fue cuantificado usando un espectrofotómetro (PerkinElmer, LS 55) a una longitud de onda de 260 nm. Para determinar la integridad del ARN total se corrió una alícuota de 5 μ l en un gel de agarosa al 2% preparado con TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) como disolvente en condiciones reductoras, una vez asegurada la integridad, la muestra fue almacenada a -70° C, hasta su uso para la retro transcripción (RT-PCR).

LA RT-PCR se llevó a cabo usando un kit para la transcriptasa reversa, SuperScript One Step RT-PCR with Platinum *Taq* (10928-034, Invitrogen, Carlsbad, California).

Total ARN (1 μ g) fue transcrito en un volumen total de 50 μ l conteniendo lo siguiente:

Componentes	Volumen
2x Reaction Mix	25µl
Muestra de ARN	3 µl
Primer Sentido (µM)	1 µl
Primer Anti Sentido (µM)	1 µl
RT/Platinum <i>Taq</i> Mix	1 µl
Agua Inyectable	19 µl

Una vez realizado el mix para cada una de las muestras analizadas, se colocaron en el termociclador marca Quanta Biotech S-24 y se corrió el siguiente programa por 40 repeticiones bajo las siguientes condiciones:

Inicio/Fin	Proceso	Temperatura	Tiempo
	Alineamiento	50°C	30 min
	Alineamiento	94°C	2 min
Comienza Ciclo	Desnaturalización	94°C	15 seg
	Alineación	55°C	30 seg
Fin del Ciclo	Elongación	72°C	1 min
	Elongación Final	72°C	5 min
	Almacenamiento	10°C	

Los primers utilizados fueron los siguientes:

Específico para género *Naegleria* (Schild M., 2006)

Nae3 Fwd 5'- CAA ACA CCG TTA TGA CAG GG -3'

Nae3-Rev 5'- CTG GTT TCC CTC ACC TTA CG -3'

Para la amplificación del gen 18S *Naegleria fowleri* (Shin, 2001)

Nfa1 Fwd 5'-TGG CCA CTA CTA TTC CAT C -3'
Nfa1 Rev 5'- AGC ACT CCC TTG TAC TTC -3'

Posteriormente se hizo el corrimiento electroforético de los productos de RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, California) en un gel de agarosa al 1 % (SIGMA), para cargar las muestras en el gel, se mezclaron 2 µl de tinte de carga más 5 µl de producto de RT-PCR y 2µl del marcador de peso molecular (Fermentas). El gel se corrió con buffer TAE al 1% con 80V por 40 min. Al término, el gel fue visualizado en un transiluminador UV a 260 nm de longitud de onda.

6.7 Secuenciación

La secuenciación se realizó en el laboratorio de Bioquímica Molecular ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala). A partir de los productos de RT-PCR de *Naegleria fowleri* y *Naegleria sp.* obtenidos con los primers Nfa1 Fwd y Rv (Shin, 2001).

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron analizados, editados y alineados con el programa BioEdit v7.2.5, utilizando los electroferogramas de las secuencias Fwd y Rv como base para editar posibles errores o artefactos y obtener una secuencia consenso a partir de ambas secuencias, tratando así de tener una secuencia más confiable y certera.

Una vez editadas las secuencias se utilizó el programa Geneious R7 para hacer la comparación de las secuencias obtenidas con secuencias reportadas en el GenBank mediante alineación múltiple de secuencias y obtener así parámetros como porcentaje de similitud entre pares de bases totales.

6. RESULTADOS

6.1 Trofozoíto

El promedio de los trofozoítos de *Naegleria sp.* es de 19.82 μm de largo y 9.92 μm de ancho.

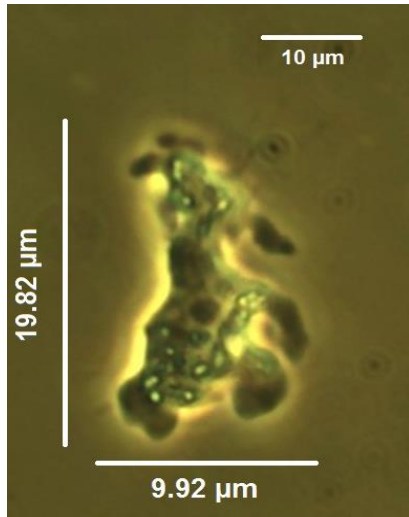


Figura I Trofozoíto de *Naegleria sp.*



Figura II Trofozoíto de *Naegleria sp.*

6.2 Quiste

En la fase de quiste, el tamaño promedio es de 12.32 μm de diámetro. Durante esta fase se observaron de 2 a 3 poros incluso esporádicamente se observaron hasta 6 poros.

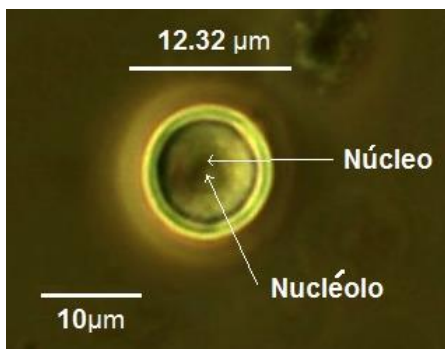


Figura III Quiste de *Naegleria sp.*

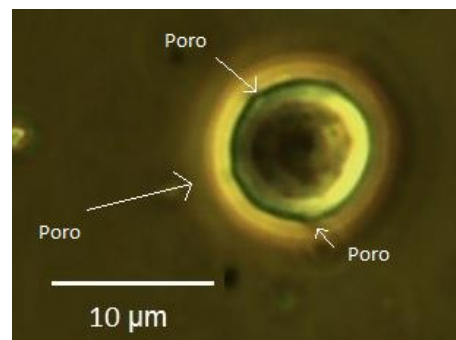


Figura IV Quiste de *Naegleria sp.*

6.3 Flagelación

Las amibas sometidas a la prueba de flagelación dieron resultado positivo en su totalidad, se observó la presencia de un flagelo y en algunas ocasiones dos, la flagelación ocurrió a las 4 horas de iniciar la prueba aproximadamente.

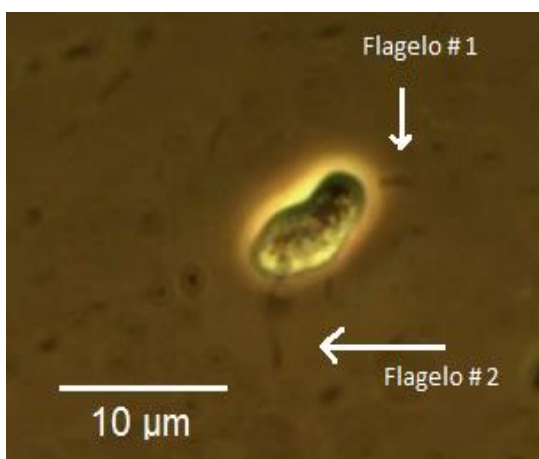


Figura IV Fase flagelar de *Naegleria* sp.

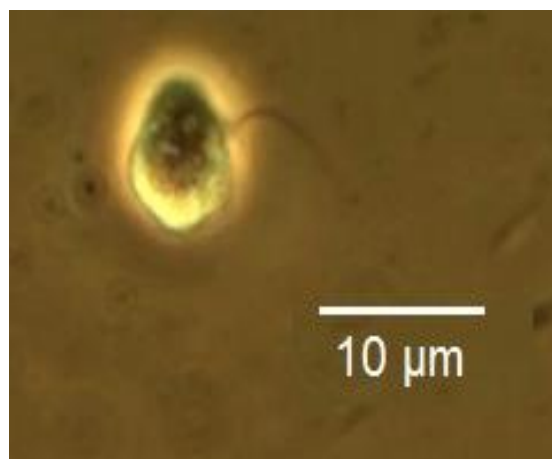


Figura VI Fase flagelar de *Naegleria* sp.

Por lo tanto, considerando las características del trofozoíto, del quiste, presencia de la forma flagelada, morfológicamente, la amiba en estudio pertenece al género *Naegleria* según las claves taxonómicas de Page (1988).

6.4 Prueba de Patogenicidad y Temperatura.

Aproximadamente a las 48 horas. posteriores a la inoculación, los ratones mostraron baja respuesta a los reflejos, postura encorvada, aislamiento y pelaje erizado; sin embargo, los ratones se recuperaron a las 72 horas., sobreviviendo los 21 días que duró la prueba. Tales resultados indicaron que la especie *Naegleria* en estudio es una especie amibiana patógena aunque su virulencia es muy baja. En relación a la prueba de tolerancia a la temperatura, *Naegleria* sp. demostró tener un crecimiento óptimo a 25°C, las otras temperaturas provocaron que las amibas se enquistaran aproximadamente a las 24 h de la siembra.

Cuadro I. Comparativo de Representantes del Género *Naegleria* (Page, 1988)

	Temperatura	Patogenicidad en Ratones	Tamaño del Quiste	Medio de Crecimiento	Presencia de Poros
<i>Naegleria fowleri</i>	30°C - 45°C	Si	12 µm	Bactocasitona	Si
<i>Naegleria jadini</i>	20°C - 30°C	No	13.9 µm	Bactocasitona	No
<i>Naegleria gruberi</i>	20°C - 30°C	No	13 µm	Bactocasitona	Si
<i>Naegleria lovaniensis</i>	30°C - 45°C	No	11.5 µm	Bactocasitona	Si
<i>Naegleria sp.</i>	22°C - 25°C	Si*	12.32 µm	Ringer	Si 3 a 6

* Se define como patógena basados en las revisiones de los términos virulencia y patogenicidad realizada por Soriano, *et. al.* 2005.

6.5 RT-PCR

Se observó el producto de la RT-PCR correspondiente al gen específico para género de *Naegleria*. Con los oligos utilizados, Nae-Forward y Nae- Reverse se obtuvo un producto de 183 pb.

De igual manera se observaron los productos de la RT-PCR correspondiente al gen específico para la especie *N. fowleri*. Con los oligos utilizados, Nfa1-Forward y Nfa1- Reverse se obtuvo un producto de 360 pb.

Los productos de PCR de todas las muestras del género *Naegleria sp.* mostraron haber amplificado el gen 18s rADN y el gen Nfa1, como se puede observar en la figura VII.

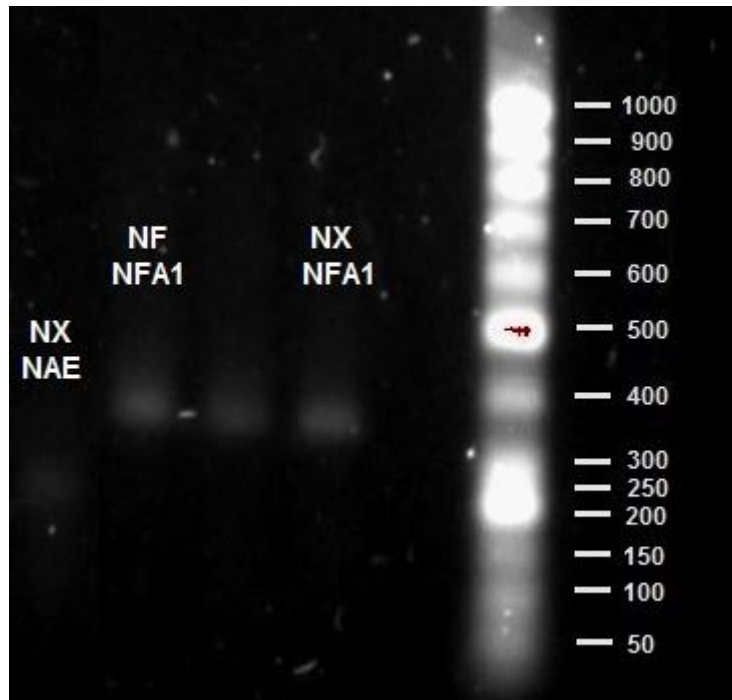


Figura VII Gel de agarosa al 1%, correspondiente a los productos de RT-PCR obtenidos a partir de *Naegleria sp.* (NX) y *Naegleria fowleri* (ATCC) (NF) con los primers NAE y NFA1.

6.6 Secuenciación

Las secuencias de los productos de RT-PCR de *N. fowleri* y de *N. sp.* para el gen Nfa1 se ajustaron al producto esperado de 360 pb obteniéndolas a partir de los primers Nfa1Fwd Y Nfa1Rv respectivamente, fueron alineadas con el programa Geneious R7 mediante alineación múltiple y se obtuvo un 100% de similitud entre las secuencias de *N. fowleri* y de *N. sp.* con la secuencia de *Naegleria fowleri* reportada en Gen Bank con número de registro AY701742 (Shin, 2011).

6.6.1 Alineamiento

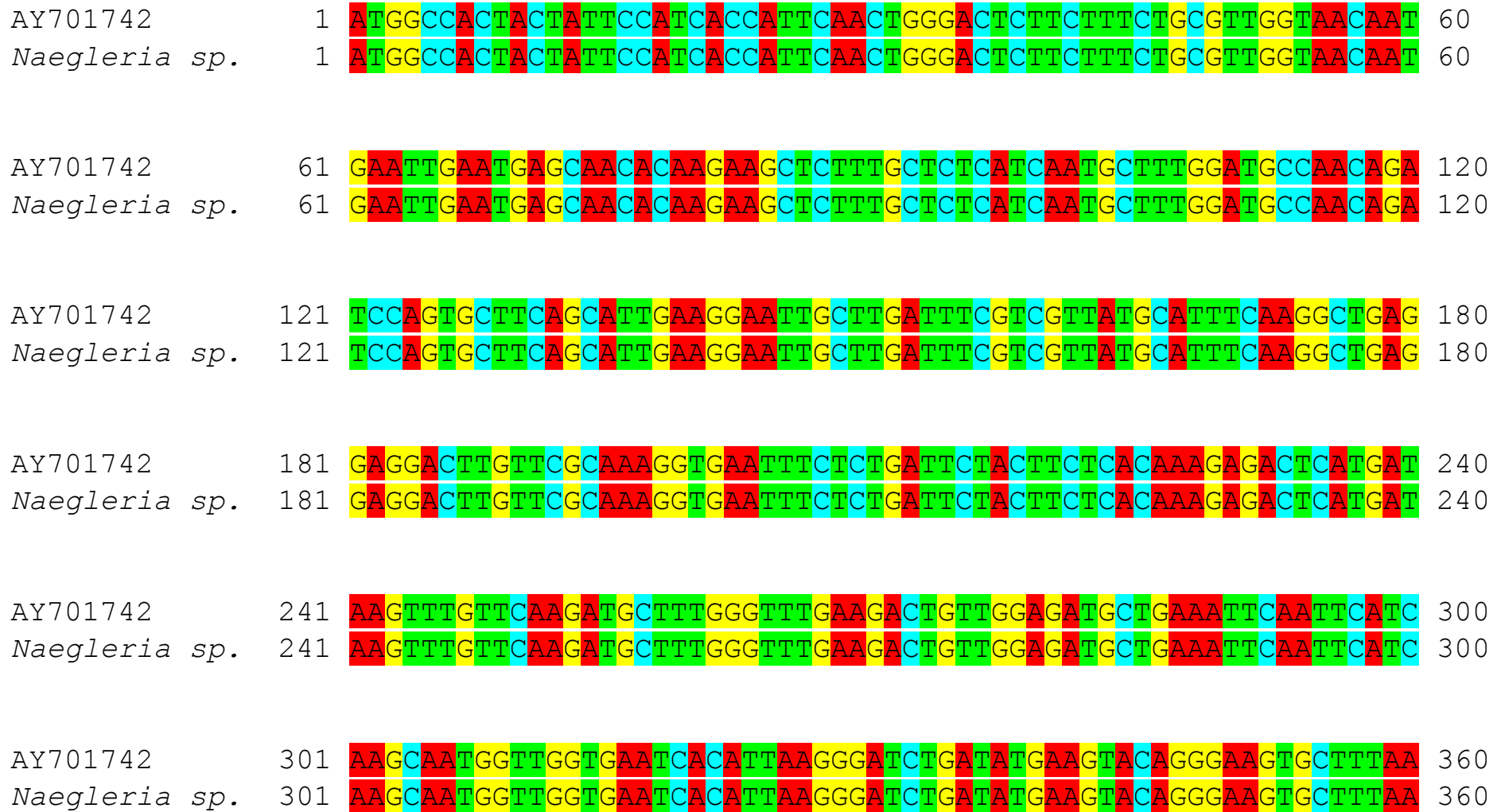


Figura VIII. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen *Nfa1* (360 pb) con *Naegleria sp.*, se muestra una similitud del 100%, Secuencia *Nfa1*, GenBank numero de acceso AY701742.

7. DISCUSIÓN

Las amibas de vida libre están distribuidas alrededor de todo el mundo y su composición y localización depende de las condiciones de cada lugar en particular. Los resultados obtenidos muestran que las características morfológicas de la cepa en estudio corresponden al género *Naegleria*. En promedio el quiste es un poco mayor en tamaño que *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, pero un poco menor que *N. gruberi*, de esta manera no se puede decir que bajo este parámetro pertenezca a alguna de las especies descritas por las claves de Page (Cuadro I).

Una característica notable es que la cepa en estudio no se desarrolla en el mismo medio de cultivo que *N. fowleri*. Después de probar los medios de cultivo usuales (Chang y Bactocasitona) sin éxito, solamente se logró el crecimiento amibiano en el medio Ringer, en cuya composición solo se incluyen sales, no se incluyen fuentes de carbono, ni de carbohidratos y si en los medios Chang y Bactocasitona, lo que le confiere una particularidad notable, esto se puede deber a las condiciones y nutrientes del medio donde fue aislada, cabe mencionar que el medio Ringer fue enriquecido con suero de ternera con antibiótico al 10% con el fin de incrementar el crecimiento.

Por otro lado, aunque la cepa en estudio se aisló de agua a una temperatura de 33°C, el desarrollo óptimo en el laboratorio es de 20°C a 25°C marcando una diferencia importante en relación a las especies patógenas del género *Naegleria* ya que en general estas suelen ser termófilas, es decir, crecen a temperatura entre 30°C y hasta 45°C (Martínez, 1997).

Con respecto a la prueba de patogenicidad, la cepa problema se muestra como una especie patógena aunque muy poco virulenta (Soriano, *et. al.* 2005) ya que aunque los ratones mostraron algunos signos característicos de la enfermedad a

las 48 horas, finalmente se recuperaron y sobrevivieron el periodo de la prueba, a diferencia de *Naegleria fowleri*, que es altamente virulenta y termófila.

De acuerdo a los criterios morfológicos, la cepa en estudio es muy semejante a *Naegleria gruberi*, pero difiere en ciertas características como el tamaño del trofozoíto, el medio de cultivo en el que se desarrolla, constituyendo una diferencia fisiológica importante con el género *Naegleria*, lo que nos lleva a descartar que se trate de *Naegleria gruberi*, en general comparte varios parámetros con el género aunque presenta diferencias puntuales.

En relación con el análisis molecular (Fig. VII), los resultados muestran que *Naegleria sp.* contiene y expresa el gen NAE reportado como específico para el género *Naegleria* (Schild, 2006), por lo que se confirma molecularmente que es una especie perteneciente a este género.

Asimismo, también se demostró la presencia y expresión del gen Nfa1, el cual según Shin en 2001, es específico para la especie altamente patógena *Naegleria fowleri*, lo cual no se cumple con la cepa en estudio, pues como se demostró con la prueba de patogenicidad, la amiba en estudio es muy poco virulenta, además de las diferencias morfológicas y fisiológicas ya mencionadas.

Las diferencias en la virulencia entre *Naegleria sp.* y *Naegleria fowleri* deben de ser atribuidas a algún otro factor o conjunto de factores de virulencia, dado que como se observa en la figura VIII, no hay diferencia alguna entre las secuencias del gen Nfa1 para *Naegleria fowleri* (No. AY701742) y *Naegleria sp.* teniendo una similitud total (100%) por lo que la proteína codificante a partir de este gen expresado es igual en ambas especies. Este resultado sugiere que efectivamente la virulencia es multifactorial (Herman, 2013) y que no es suficiente que la secuencia de genes sea exactamente igual. De acuerdo con lo anterior, deben existir otros factores que pueden ser ambientales o fisiológicos que determinen la expresión de la virulencia.

Se ha descrito que la virulencia es multifactorial (Herman, 2013). También puede influir el tamaño de la amiba, así como la poca resistencia de las amibas frente al cambio del medio de cultivo a la mucosa nasal, por lo que esto podría explicar que a pesar de contener y expresar un gen que codifica para un factor de virulencia, la amiba en estudio es poco virulenta.

Es importante seguir con estos estudios ya que seguramente existen más amibas que no han sido descritas en México o probablemente no en sitios particulares de la República Mexicana.

Es posible que la ecología de estos organismos esté cambiando por factores que desconocemos pero es interesante conocer las posibles modificaciones a nivel molecular y morfológico, de esta manera enfocarlas hacia un fin benéfico, llámese vacunas, bibliografía de referencia o demás vertientes que pudieran surgir, pero también para estar alerta ya que el espectro de especies con potencial patógeno, podrían representar un riesgo a la salud en los seres humanos. Sobre todo si se considera que la mayoría de zonas o lugares donde encontramos estos organismos son centros de recreación o de sanación, como las aguas termales, tinas de hidroterapia, estos últimos usadas en general por personas inmunodeprimidas (Rivera *et al.*, 1988; Rivera *et al.*, 1993), etc. Se puede decir que el riesgo tiende a ser alto, aunado a la poca información difundida y conocida por la población biomédica y civil hacen que estos organismos sean un peligro potencial.

Esta amiba comparte características particulares y en teoría específicas como la expresión de Nfa1 codificante para una proteína ubicada en los lobópodos de *Naegleria fowleri*, teniendo algunas diferencias importantes como la temperatura óptima. La prueba de secuenciación nos proporciona pistas importantes sobre los factores de virulencia en el género *Naegleria*, tales como comprobar que la virulencia es multifactorial, ya que la proteína expresada por el gen Nfa1 interviene en la adhesión de la amiba al epitelio nasal (Shin 2001), pero esto no quiere decir que sea el único factor que intervenga para la infección por *Naegleria fowleri*.

8. CONCLUSIONES

- Basados en criterios morfológicos y moleculares la cepa en estudio se identificó como *Naegleria sp.*
- Los parámetros óptimos de crecimiento para *Naegleria sp.* son diferentes a los reportados para otras especies del género.
- *Naegleria sp.* es patógena pero poco virulenta.
- El producto de RT-PCR para el gen Nae, reportado como específico para el género *Naegleria* fue amplificado por *Naegleria sp.*
- El producto de RT-PCR para el gen Nfa1 que es reportado como específico para *Naegleria fowleri* fue amplificado por *Naegleria sp.*
- Se determinó que las secuencias del gen Nfa1 correspondientes a *Naegleria fowleri* y a *Naegleria sp.*, son idénticas.
- Molecularmente la amiba en estudio es similar a *N. fowleri* tomando en cuenta los genes incluidos en el estudio, sin embargo, no se puede afirmar que así sea, ya que existen varias diferencias morfológicas y fisiológicas. Por lo que tampoco se descarta que se trate de alguna especie no descrita.

9. LITERATURA CITADA

- ❖ Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. 2012, *The revised classification of eukaryotes*. J. Eukaryot Microbiology. 59:429-481 pp.
- ❖ Bonilla L. P., Ramírez, E., Ortiz, R., Eslava, C. 2004. *La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos*. En: I. Rosas, A. Cravioto y E. Ezcurra. Microbiología Ambiental SEMARNAT, INE, UNAM. PUMA 67-81pp.
- ❖ Bonilla P. y Ramírez. E., 2014. *Amibas de vida libre patógenas y oportunistas*. En: Becerril. M. A. *Parasitología Médica*. 4ª Ed. Ed. Mc Graw-Hill 37-51pp.
- ❖ Bonilla P., López M.B., Alfaro I., Ibarra M.R., Ortiz R., Rojas M., Rojas S. 2012. *Isolation of Free-Living Amoebae from Thermal Springs that Supply Swimming Pools of a Recreational Center in Hidalgo, Mexico*. ASM 2012. 112th General Meeting. San Francisco, California, U.S.A.
- ❖ Bravo F.G., Seas C. 2012. *Balamuthia mandrillaris Amoebic Encephalitis: An Emerging Parasitic Infection*. Curr Infect Dis Rep. 14(4):391-396, DOI: 10.1007/s11908-012-0266-4
- ❖ Callicott J H J., 1968, Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the *Hartmannella (Acanthamoeba) Naegleria* group. American J. Clinic Pathology; 49: 84-91.
- ❖ Carter R.F., 1968 *Primary amoebic meningo-encephalitis: clinical, pathological, and epidemiological features of six fatal cases*. J. Pathology Bacteriology; 1-25pp.
- ❖ Cerva, L., 1967, *Intranasal, intrapulmonary and intracardial inoculation of experimental animals with Hartmanella castellanii*. Folia Parasitology. (Prague) 14:207-215.
- ❖ Cerva L., Novak K., 1968 *Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities*. Science; 160: 92.
- ❖ Cerva L., Novak K., Culbertson C G. 1968 *An outbreak of acute, fatal amoebic meningoencephalitis*. Ambiental J. of Epidemiology ; 88: 436-44 pp.
- ❖ Cho M.S., Jung S.Y., Park S., Kim K.H., Kim H.I., Sohn S., Kim H.J., Im K.I., Shin H.J., 2003. *Immunological characterizations of a cloned 13.1- kilodalton protein from pathogenic Naegleria fowleri*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10:954–959.
- ❖ De Jonckheere, J.F., 1983. *Isoenzyme and Total Protein Analysis by Agarose Isoelectric Focusing and Taxonomy of the Genus Acanthamoeba*, J. Protozool, 701 – 706 pp.

- ❖ De Jonckheere J.F., 2002. *A century of research on the amoeboflagellate genus Naegleria*. Acta Protozool. 41: 309-342 pp.
- ❖ De Jonckheere J.F., 2004 *Molecular definition and the ubiquity of species in the genus Naegleria*. Protist 155: 89-103 pp.
- ❖ De Jonckheere J.F., Brown S. 2005. *The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing*. Protist 156: 89-96 pp.
- ❖ De Jonckheere, J.F., 2006. *Isolation and molecular identification of vahlkampfiid amoebae from an island (Tenerife, Spain)*. Acta Protozool. 45: 91-96.pp.
- ❖ De Jonckheere J.F., 2011. *Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate Naegleria fowleri*. Infect. Genet. Evol. 11, 1520–1528pp.
- ❖ Ferrante, 2007 A. *Free-living amoebae: pathogenicity and immunity*. Parasite Immunology. 13: 31-47 pp.
- ❖ Guzmán F.E, De Jonckheere, J.F., Lares V.F., 2008, *Identificación de especies de Naegleria en sitios recreativos en Hornos, Sonora*. Rev. Mex. Biodiv. 2008, vol.79, n.1, pp. 1-5.
- ❖ Herman E.K., et al. *The mitochondrial genome and a 60-kb nuclear DNA segment from Naegleria fowleri, the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis*. J. Eukaryot Microbiol. 2013; 60: 179–191.
- ❖ Howe D.K., M. H. Vodkin, J. N. Robert, G. S. Visvesvara y G. L. McLaughlin, 1997. *Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of Acanthamoeba spp.* Parasitology Research, 83: 345-348.pp.
- ❖ INEGI. 1992. *Síntesis Geográfica del Estado de Hidalgo*. 134 pp.
- ❖ Kang S.Y., Song K.J., Jeong S.R., Kim J.H., Park S., Kim K., Kwon M.H., Shin H.J., 2005. *Role of the Nfa1 protein in pathogenic Naegleria fowleri cocultured with CHO target cells*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:873–876 pp.
- ❖ Kilvington, S. & Warhurst, D.C.1969 *Isolation of amoebas from the air*. J. Med. Microbiol. 2: 27-36 pp.
- ❖ Kim J.H., Sohn H.J., Lee J., Yang H.J., Chwae Y.J., Kim K., Park S., Shin H.J., 2013 *Vaccination with lentiviral vector expressing the nfa1 gene confers a protective immune response to mice infected with Naegleria fowleri*. Clin Vaccine Immunol. doi: 10.1128/CVI.00210-13.

- ❖ Lares-Villa F. 2001. *Free-living amoebae infections in Mexico. IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity on Free-Living Amoebae*. En: S. Billot-Bonef, P.A. Cabanes, F. Marciano-Cabral, P. Pernin, E. Pringuez, Editors, John Libbey Eurotext, Paris. 13–18pp.

- ❖ Lehmann, O. J., S. M. Green, N. Morlet, S. Kilvington, M. F. Keys, M. M. Matheson, J. K. G. Dart, J. I. McGill y P. J. Watt, 1998. *Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of Acanthamoeba keratitis*. IOVS., 39(7): 1261-1265 pp.

- ❖ López M., 2014, *Amibas de Vida Libre En Manantiales de Aguas Termales del Parque EcoAlberto Ixmiquilpan*, Hidalgo, México. Tesis, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

- ❖ Martínez J.M., Visvesvara G S, Chandler F W. Free-Living Amebic Infections. En DH Connors, F W Chandler, D A Schwartz, H J Manz, E E Lack, 1997. *Pathology of infectious Diseases, Vol II*. Ed. Appleton & Lange. Stamford, Connecticut.

- ❖ Oddo D., 2006. *Infecciones por amibas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos*. Instituto Nacional del Cáncer Unidad de Anatomía Patológica Santiago de Chile

- ❖ Page, F.C., 1988. *A new key to freshwater and soil gymnamoebae*. Culture Collection of Algae and Protozoa, Cumbria

- ❖ Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J.J., Rodríguez, S. and Alcocer, J. 1988. Pathogenic amoebae in natural waters of three resorts of Hidalgo, México. *Environmental Research*. 50: 289-295.

- ❖ Rivera F., Cerva, L., Martínez, J., Keleti, G., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Graner, S., Saha, A. and Glew, R. 1990. *Naegleria lovaniensis tarasca* new subspecies and the Purepecha strain a morphological variant of *N. lovaniensis*, isolated from natural thermal waters in Mexico. *J. of Protozoology*. 37(4): 301-310.

- ❖ Rivera F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez S., Ortiz R., Zaldiva., Ramirez P., Duran A., 1993, Pathogenic and Free-living Amoebae Isolated from Swimming Pools and Physiotherapy Tubs in Mexico., *Environmental Research* 62: 43-52.

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

- ❖ Schuster F., Visvesvara G.S., 2004, *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals*, *International J. for Parasitology* 34, 1001–1027 pp.

- ❖ Schild, M., Gianinazzi, C., Gottstein, B., Muller, N. 2007. *PCR-based diagnosis of Naegleria sp. infection in formalin-fixed and paraffin embedded brain sections*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 564-567 pp.

- ❖ Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J. 2001. *Use of subgenomic 18S ribosomal ADN PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1903-1911 pp.

- ❖ Shin HJ, Cho MS, Jung SU, Kim HI, Park S, Kim HJ, Im KI. 2001. *Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiology.* 48:713–717.

- ❖ Soriano, E.V., Salgado, M.C., Suarez, G.F., Trigo, T. F., *Patogenia microbiana: Conceptos Basicos En IA Interaccion Hospedero-Huesped*, 2006, e-journal, Unam, *Vet. Mex.* 37. 457-465pp

- ❖ Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M.S., Muller, N. 2004. *The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria*. *Parasitol. Res.* 92: 405-413 pp.

- ❖ Vargas-Zepeda J, Gómez-Alcalá AV, Vázquez-Morales JA, Licea-Amaya L, De Jonckheere JF and Lares-Villa F., 2005. *Successful Treatment of Naegleria fowleri Meningoencephalitis by Using Intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rifampicin*. *Arch Med Res.* 83 – 86 pp.

- ❖ Visvesvara G. S., De Jonckheere J. F., Marciano-Cabral F., Schuster F. L. 2005. *Morphologic and molecular identification of Naegleria dunnebecki, n. sp. isolated from a water sample*. *J. Eukaryot. Microbiology* 52: 523-531 pp.

- ❖ Vodkin, M. H., D. K. Howe, G. S. Visvesvara y G.L. Mc Laughlin, 1992. *Identification of Acanthamoeba at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction*. *J. of Protozoology.* 39(3): 378-385 pp.

- ❖ <http://www.cnn.com/2013/08/24/us/brain-eating-parasite-boy-dead/>

- ❖ <http://www.cnn.com/2013/09/11/health/arkansas-amoeba-survivor-home/>

- ❖ <http://www.cnn.com/2013/08/22/health/amoeba-case-florida/index.html/>
- ❖ <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html/>
- ❖ <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html/>

ANEXO

Medio Ringer

Se prepara con los siguientes elementos:

NaCl	6.0 g
KCl	0.075 g
CaCl ₂	0.1 g
NaHCO ₃	0.1 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7 – 7.4

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos, dejarse enfriar y agregar suero con antibiótico al 10%, concentración final del medio.