



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

DETECCION DE AMIBAS DEL GRUPO *Naegleria-Acanthamoeba*
EN PACIENTES CON MENINGOENCEFALITIS,
RINITIS Y QUEMADURAS INFECTADAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciado en Biología.
P R E S E N T A :
JESUS RAMIREZ ANGELES

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A DIOS PORQUE EL ES, SEÑOR Y REY.

A MI MADRE:

ADELA ANGELES RODRIGUEZ.

CON EL MAS PROFUNDO AMOR Y RESPETO, QUIEN
CON UN GRAN CARIÑO ME HA BRINDADO TODO SU APOYO
Y COLABORACION EMPRENDEDORA Y ENTUSIASTA Y COMO
UN RECONOCIMIENTO AL ESFUERZO QUE REALIZO PARA
QUE ALCANZARA ESTA META.

A MI HERMANA.

MA. ELENA RAMIREZ ANGELES.

POR SU CARIÑO Y COMPRESION Y EN ESPERA
DE QUE SU DESEO DE SUPERACION SEA LO MAS IMPOR-
TANTE.

AL DR. FERMIN RIVERA AGUERO.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO POR SU VALIOSA
AYUDA Y APOYO PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

AL Q.B.P. FERNANDO LARES VILLA.

GRACIAS POR TU VALIOSA AYUDA, POR EL
ESTIMULO Y LA AMISTAD QUE TAN DESINTERESAMENTE
ME HAS OFRECIDO.

I N D I C E

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	11
METODOLOGIA	12
MUESTREO	13
AISLAMIENTO DE LAS AMIBAS	15
IDENTIFICACION MORFOLOGICA	16
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	18
ISOELECTROENFOQUE	20
RESULTADOS	24
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	49
SUGERENCIAS	50
BIBLIOGRAFIA	51
APENDICE	59
MATERIAL BIOLOGICO	60
MEDIOS DE CULTIVO	61
METODO DE TINCION DE LAS AMIBAS	66
REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA LAS PRUEBAS DE ISOELECTROENFOQUE	70

RESUMEN.

Con el propósito de aislar amibas de vida libre de los géneros Naegleria-Acanthamoeba asociados a patologías en humanos, se realizó un muestreo en siete centros hospitalarios del I.S.S.S.T.E. e I.M.S.S., en pacientes con meningoencefalitis de etiología a determinar, pacientes con rinitis crónica y pacientes con infecciones secundarias a quemaduras, durante un período comprendido entre enero y octubre de 1986. Se obtubieron 182 muestras de líquido cefalorraquídeo, 529 muestras de exudados nasales y 60 secreciones seropurulentas producidas en pacientes con quemaduras, aislándose en 9 muestras de exudados nasales y en 5 muestras de secreciones seropurulentas, un total de 14 cepas de amibas de vida libre pertenecientes al género Acanthamoeba. 12 cepas manifestaron patogenicidad en ratón cuando se inocularon por vía intracerebral e intranasal. La identificación a nivel de especie se logró tomando en cuenta los criterios morfológico, pruebas de patogenicidad y pruebas bioquímicas estableciendo que las cepas correspondieron a las especies: A. lugdunensis (2 cepas), A. mauritaniensis (4 cepas), A. rhyodes (1 cepa), A. palestinensis (2 cepas), A. divionensis (1 cepa), y A. polyphaga (4 cepas).

INTRODUCCION.

Los protozoarios constituyen un grupo heterogéneo de organismos microscópicos unicelulares, eucarióticos de origen polifilético y evolución divergente, por lo que constituyen una extensa variedad de seres vivos, totalmente distintos entre sí (es por ello que han logrado aprovechar una gran variedad de ambientes, principalmente lugares donde hay humedad o una película de agua presente). Estos organismos varían en tamaño de 1 μ m a 50 μ m o más, midiendo la mayoría entre 5 y 250 μ m. En general, los protozoarios presentan un núcleo, pero algunos son multinucleados y los Ciliophora (phylum) son heterocarióticos, lo que significa que poseen dos tipos de núcleos, presentan reproducción sexual y/o asexual dependiendo del grupo y algunos protozoarios forman colonias. En la actualidad existen cerca de 65 000 especies de protozoarios descritas, de las cuales más de la mitad son fósiles y 10 000 son parásitas. Según el sistema de clasificación de 5 reinos, propuesta para los seres vivos por Whittaker en 1969, los protozoarios son un subreino del Reino Protista (Levine et al., 1980).

② Las amibas de vida libre como agentes causantes de patologías humanas han adquirido importancia desde 1965, cuando Fowler y Carter (1965) reportaron el primer caso de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) causada por Naegleria fowleri. En este sentido - -

2

también fue importante la descripción del caso de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) en el hombre producida por Acanthamoeba sp., hecha por Kenny (1971).

El género Naegleria pertenece a la familia Vahlkampfiidae del orden Schizopyrenida que se caracteriza porque el trofozoíto forma un lobopseudópodo eruptivo grueso, cilíndrico y hialino de rápida locomoción (más de dos veces la longitud de su cuerpo por minuto), fase activa en la que se reproduce y alimenta. Estas amibas son típicamente uninucleadas, el núcleo tiene un nucléolo de ribonucleoproteína y el DNA distribuido en la periferia. Naegleria mantiene su nucléolo durante la división y la membrana nuclear permanece intacta durante la mayor parte del proceso promitótico, posee quistes redondeados, siempre con poros, que le permite una rápida diseminación natural, cuando las características ambientales no le son favorables (Fulton, 1983). El estadio temporal flagelar con dos a cuatro flagelos (Rivera et al., 1978) es común, cuando los nutrientes del medio disminuyen. El trofozoíto tiene un tamaño de 15 a 25 μm y el quiste un diámetro de 7 a 15 μm .

Naegleria fowleri es la especie más patógena del género (Carter, 1970). Ha sido aislada de agua de estanque (Nelson, 1972), agua de grifo (Cain, 1979), de piscinas cubiertas, con temperatura

a más de 25° C (Cain, 1979), de lagos (Chang, 1975; Shumaker, --- 1971) de los efluentes de fábrica (De Jonckheere, 1978) y de suelo (Anderson, 1972; Chang, 1975). Puede decirse que N. fowleri es - - cosmopolita en cuanto a su distribución en el ambiente. Sin embargo, la mayoría de los aislamientos se han hecho de hábitats manejados o alterados de alguna manera por el hombre.

* La meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) es la enfermedad producida por N. fowleri en los humanos (Butt, 1966; Carter, - 1972). Es una enfermedad de comienzo brusco y curso fulminante -- (Duma, 1969). Ocurre preferentemente en niños sanos y adultos jóvenes con antecedentes de natación en piscinas u otras masas de -- agua dulce como ríos y lagos. La infección es producida por inhalación de agua que contenga las amibas o los flagelados, así como -- también se ha propuesto llegar a la infección por inhalación de -- quistes, durante las tolvaderas (Dos Santos, 1970; Lawande, 1979).

La MEAP se caracteriza por la aparición brusca de cefalea, -- fiebre, náuseas, vómitos (generalmente en proyectil) signos de - - irritación meníngea y encefalitis. Ocasionalmente también hay faringitis y signos de catarro nasal. Generalmente hay un progreso rápido al coma y convulsiones (Martínez, 1986).

La vía de entrada es el neuroepitelio olfatorio. Las lesiones son características, destrucción de la mucosa olfatoria y los bulbos olfatorios, necrosis hemorrágica de la sustancia gris y blanca en un infiltrado inflamatorio consistente en leucocitos polimorfos nucleares, eosinófilos y algunos macrófagos, encontrándose además sólo trofozoítos en las lesiones. No hay constancia de afectación de la médula espinal ni de manifestación clínica producida por ella (parálisis flácida, hiporreflexia tendinosa, paresia intestinal o urinaria).

Los estudios serológicos no son útiles en el diagnóstico de infecciones amebianas a pesar de poder detectar anticuerpos. Lo que nos hace sospechar una MEAP es la edad del paciente, época del año, temperatura ambiental y contacto reciente con el agua. El diagnóstico definitivo se establece mediante el aislamiento y cultivo de amibas vivas obtenidas de líquido cefalorraquídeo o mediante biopsia del cerebro y encontrando los trofozoítos (Martínez, 1986).

El género Acanthamoeba pertenece a la familia Acanthamebidae del orden Amoebida con amibas típicamente uninucleadas en las que no se presenta verdadero flujo bidireccional del citoplasma ni se conoce estado flagelar (Page, 1976). Las amibas del género Acanthamoeba emiten varias proyecciones citoplásmicas finas y flexibles-

llamadas acantópodos que le sirven para adherirse al sustrato y desplazamiento (Page, 1976). El contorno del trofozoíto es oval, elongado o irregular, se han reportado centrosferas extranucleares, -- división por mitosis típica. Los quistes o forma de resistencia a condiciones adversas del medio (Page, 1976) poseen doble pared poliédrica o marcadamente biconvexa, con pared de celulosa, un endoquiste más o menos poligonal o estrellado y exoquiste ondulado. Lo que le ha permitido sobrevivir varios años a severas sequías (Kings-ton, 1969). Presentan exquistamiento por remoción del óperculo al punto de contacto entre endoquiste y ectoquiste. El trofozoíto tiene un tamaño de 15 a 40 μm y el diámetro del quiste es de 8 a 20 μm (Page, 1976).

Las amibas del género Acanthamoeba han podido ser aisladas de la atmósfera (Rivera et al., 1987), las piscinas (Rivera et al., -- 1978) , los alimentos e individuos sanos (Rivera et al. 1984,1986). Varios reportes publicados hasta la fecha señalan que algunas cepas patógenas de los géneros Naegleria-Acanthamoeba pueden estar presentes como "fauna normal" en las regiones bucal y faríngea de portadores sanos (Abraham y Lawande, 1986; Martínez, 1977; Rivera et al., 1986). Además de los exudados nasales examinados por Chang et al. (1975), evidenciaron que estas amibas se aíslan más frecuentemente de pacientes con rinitis repetitiva, asociadas a epistaxis y cefalea

o una mucosa nasal anormal. Actualmente se sabe, sin duda alguna, que las acanthamoebas patógenas son el agente causal de las siguientes patologías en los humanos: encefalitis amibiana granulomatosa, queratitis, dermatitis y ulceraciones de la piel (Martínez, 1986).

* La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) es la enfermedad producida por Acanthamoeba spp. Esta enfermedad es más incidiosa que la producida por Naegleria fowleri y con un curso clínico -- parecido al que producen las lesiones ocupantes de espacio (tumores y abscesos). Precozmente aparecen signos neurológicos focales, -- hemiparesia y convulsiones dependiendo de la zona del cerebro afectada. La alteración de la conciencia es un síntoma bastante prominente de la EAG. La fiebre es esporádica y generalmente no alcanza grandes temperaturas. En un 40% de los casos aparece rigidez de -- nuca, aparece precozmente náusea, vómitos y letargia, así como también puede presentar parálisis de nervios craneales (Cain, 1981; -- Carter, 1981).

Otras manifestaciones clínicas son alteraciones de la conciencia, diplopia, paresias, letargia, ataxia cerebelosa y coma. Los -- signos de focalidad neurológica suelen ser muy prominentes y aparecen muy precozmente (Martínez, 1982). La causa de la muerte suele ser bronconeumonía, e insuficiencia hepática o renal, asociadas con septicemia.

La vía de entrada puede ser el tracto respiratorio por inhalación del aire, aerosoles y polvos contaminados con quistes o trofozoítos (Lawande. 1980), por la inhalación de agua conteniendo las amibas o quistes, y ulceraciones de la piel u otras heridas, siendo la hematógena la más directa a la infección.

El período de incubación es desconocido (Martínez, 1983). Se necesitan varias semanas o meses para que se establezca la enfermedad. Los signos de meningitis y encefalitis son bastante vagos. El curso clínico es largo. Los síntomas clínicos de la EAG son ambiguos y generalmente se presentan lentamente. Todos los síntomas se presentan en pacientes con enfermedades crónicas sin contacto con el agua. Los síntomas son parecidos a los de la leptomeningitis bacteriana, meningitis tuberculosa, encefalitis viral, absceso cerebral o masa ocupante de espacio. Algunos pacientes con EAG presentan nódulos cutáneos unos días antes de la aparición de la sintomatología neurológica. Las biopsias de dichos nódulos muestran una dermatitis crónica y granulomatosa con trofozoítos y quistes. La biopsia cerebral puede ser útil para establecer el diagnóstico y excluir otras lesiones tratables como la meningoencefalitis por Herpes simplex.

El aislamiento e identificación de los trofozoítos de Acanthamoeba y sus quistes del líquido cefalorraquídeo es un método útil en

el diagnóstico (Martínez, 1983).

2

En México se han aislado, amibas de vida libre de los géneros - Naegleria-Acanthamoeba en arroyos (Rivera et al., 1978), en lagunas de estabilización (Rivera et al., 1986), en pacientes asintomáticos que han asistido a consulta odontológica (Rivera et al., 1984), de aguas negras (Rico-Ferrat y López-Ochoterena, 1976), en tinacos de asbesto y lámina de casa-habitación (Tomasini y López-Ochoterena, -- 1980) y más recientemente Rivera y Col. (1985 y 1986), han aislado -- ambos géneros en centros recreativos y balnearios de agua termal en los Estados de Hidalgo, Michoacán y San Luis Potosí.

En México existen tres casos bien comprobados de MEAP, el primero de ellos se presentó en un joven de 16 años de edad en Mexicali Baja California (Valenzuela et al., 1984) en agosto de 1978; el segundo ocurrió en Monterrey, Nuevo León, en una niña de año y medio de edad (Rodríguez, 1984) y el tercero en un adolescente de Huetamo Michoacán, de 13 años de edad (López Corella et al., 1986). Así - - como la detección de una amiba de vida libre Naegleria lovaniensis, en un niño de dos meses de edad con meningocele e hidrocefalia (- - Rivera et al., 1985).

Por otra parte, las amibas de vida libre se han encontrado también asociadas a otitis, pneumonitis, bronquitis y rinitis (Martínez,

-1986) y a lesiones de piel producidas por quemadura e infecciones secundarias como se demuestra en este trabajo.

El papel que las amibas de vida libre patógenas pueden desempeñar en la patogenia de las rinitis aguda y crónica, así como en lesiones infectadas de la piel después de una quemadura, no está completamente dilucidado. Por ello, se decidió realizar el presente trabajo de tesis con el fin de aislar mediante cultivo, e identificar hasta nivel de especie, las amibas patógenas en pacientes con meningoencefalitis de etiología a determinar a partir de líquido cefalorraquídeo y en pacientes que asistieron al servicio de otorrinolaringología y urgencias de siete hospitales de la Cd. de México que pertenecen al I.S.S.S.T.E. y al I.M.S.S.

OBJETIVO GENERAL.

1. Detección de casos actuales de infecciones producidas por amibas de los géneros Naegleria y Acanthamoeba en pacientes con meningoccefalitis de etiología a determinar, pacientes con rinitis crónica y pacientes con infecciones secundarias a quemaduras.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.1. Aislamiento de amibas de vida libre de los géneros Naegleria - Acanthamoeba a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo - exudados nasales y secreciones seropurulentas de pacientes con quemaduras infectadas.
- 1.2. Relacionar los signos y síntomas de cada paciente con la presencia de las amibas de vida libre en el líquido cefalorraquídeo, en los exudados nasales, y en las secreciones seropurulentas de pacientes con quemaduras infectadas.
- 1.3. Determinación de la patogenicidad de las amibas de vida libre- aisladas.

METODOLOGIA.

La obtención de las muestras de líquido cefalorraquídeo y exudados nasales de pacientes con signos y síntomas de meningoencefalitis y rinitis crónica respectivamente, así como de pacientes con infecciones secundarias a quemaduras, fueron tomadas en un período de diez meses, de los siguientes centros hospitalarios del I.S.S.S. T.E. e I.M.S.S.:

Hospital General	"Adolfo López Mateos"
Hospital General	"Dario Fernández"
Hospital General	"Fernando Quiroz"
Hospital General	"Ignacio Zaragoza"
Hospital General	"Primero de Octubre"
Hospital General	"20 de Noviembre"
Centro Médico	"La Raza".

Los anteriores centros hospitalarios fueron elegidos debido a que cuentan con el equipo y personal calificado, para la toma del líquido cefalorraquídeo y corresponder a centros de concentración de zona.

1.- TECNICA DE OBTENCION DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con signos y síntomas de meningoencefalitis fueron tomadas por el personal médico de cada uno de los hospitales en los laboratorios centrales y/o de urgencias del I.S.S.S.T.E., así como del pabellón de infectología del centro médico "La Raza" del I.M.S.S.

Se virtió aproximadamente 0.5 ml de líquido cefalorraquídeo en caja de Petri conteniendo medio N.N.E. (agar no nutritivo, sembrado con Escherichia coli). La caja sembrada con el líquido cefalorraquídeo fue sellada con cinta adhesiva y etiquetada con los datos del paciente, diagnóstico médico y procedencia hospitalaria, posteriormente fue trasladada al laboratorio de Protozoología del proyecto - CyMA, donde se realizó el estudio de las muestras.

2.- TECNICA DE OBTENCION DE SECRECIONES DE PACIENTES CON QUEMADURAS

Las muestras de secreciones seropurulentas de pacientes con quemaduras infectadas, fue tomada en el servicio de urgencias y pabellón de pediatría del hospital general Ignacio Zaragoza.

Se sembró aproximadamente 0.5 ml de secreción purulenta en - -

- caja de Petri conteniendo medio N.N.E., selladas y etiquetadas -- con los datos del paciente, inmediatamente fue trasladada al labora-
-torio de Protozoología del proyecto CyMA, donde fue realizado el - estudio amebológico.

3.- TECNICA DE OBTENCION DE EXUDADOS NASALES.

Las muestras de exudados nasales de pacientes con signos y sín-
-tomas de rinitis crónica fue tomada del servicio de otorrinolarin-
-gología de los centros hospitalarios.

Se tomó con un hisopo esterilizado, y fue introducido en la -- fosa nasal a nivel medio de la cavidad, dando un giro dentro tratán-
-do de raspar la mucosa, se depositó el producto dentro del tubo -- conteniendo medio Bold esterilizado, que se utilizó como medio de-
-transporte, etiquetado con los datos del paciente y procedencia -- hoopitalaria.

Se trasladó la muestra al laboratorio del proyecto CyMA, donde fue sembrada en condiciones de esterilidad, se retiró el hisopo, se resuspendió el producto del exudado y se centrifugó a 2 500 rpm. -- durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante hasta que quedó 0.5 ml aprox. de muestra, la cual fue sembrada en medio N.N.E. tratando

de extender la muestra sobre la superficie. La caja fue sellada - para evitar la desecación del medio y se procedió al estudio amebológico.

4.- AISLAMIENTO DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo, secreciones purulentas de pacientes con quemaduras y exudados nasales, procedentes de los centros hospitalarios, fueron registradas en la carpeta de control transfiriendo los datos del paciente: Nombre, sexo, edad, registro del I.S.S.S.T.E. o I.M.S.S., procedencia y diagnóstico en caso de existir, así como fecha de muestreo, siembra e incubación, esta última previa observación al microscopio invertido.

Las observaciones de las muestras al microscopio, fueron realizadas cada 24 horas; por período de 5 días o más, anotando todo resultado en la carpeta de control. La incubación se efectuó a 37° C envueltas las cajas en una bolsa de polietileno en forma invertida para evitar la desecación del medio.

Cuando en alguna zona del medio, se observó la presencia de las amibas, se cortó un trozo de agar de aproximadamente 0.5 x 1.5 cm conteniendo las colonias amibianas y la superficie del agar.

El proceso de resiembra o transferencia se repitió hasta obtener un aislamiento puro de la cepa amibiana y así se pudo continuar con la axenización en medio SCGYEM modificado.

5.- AXENIZACION DE LAS CEPAS AMIBIANAS.

El proceso de axenización se efectuó de cultivo monoxénico de las cepas amibianas puras, se cortó un trozo de 0.5x1.5 cm del medio N.N.E., se introdujo al tubo conteniendo el medio SCGYEM modificado y fue incubado a 30 °C en forma inclinada en gradilla metálica horizontal. Se hizo observaciones cada 24 horas hasta comprobar el crecimiento. Se repitió la axenización de las cepas en que hubo contaminación, hasta que se obtuvo la axenización. Posteriormente se sembró cada semana las cepas para su preservación.

6.- IDENTIFICACION MORFOLOGICA DE LAS CEPAS AMIBIANAS AISLADAS.

Una vez lograda la axenización se precedió a la identificación morfológica de las cepas, para lo cual se basó en los siguientes -- criterios taxonómicos de los géneros Naegleria-Acanthamoeba, considerados por Page (1966, 1976): Tipo de locomoción o desplazamiento transformación ameboflagelar (criterio único para Naegleria), dimensiones del trofozoíto, morfología quística basada en los crite--

-rios propuestos por Pussard (1977) para los géneros Naegleria - --
Acanthamoeba. Las caracterizaciones microscópicas se hicieron uti-
lizando preparaciones en fresco y tinciones [se usó la técnica de -
Hematoxilina-Gomori propuesta por Cerva (1986)], a partir de culti-
vos axénicos, auxiliándose con el microscopio de contraste de fases.
Para obtener las dimensiones promedio del trofozoíto y quiste se --
midió 50 microorganismos de cada cepa amibiana aislada.

La adaptación de las amibas aisladas a los diferentes medios -
de cultivo usados también se observó y el resultado ayudó para iden-
-tificar la cepa a nivel de género (De Joncheere, 1984).

Las pruebas de transformación ameboflagelar, se hizo de la --
siguiente manera, se tomó una gota de cultivo axénico de las amibas
y se vertió en un tubo conteniendo 1 ml de agua destilada esterili-
zada y se observó en el microscopio invertido a intervalos de 20 --
minutos hasta completar tres horas. Las amibas del género Naegle--
ria se transforman en flagelados en contacto con el agua destilada,
después de 30 minutos a dos horas de haberse incubado a 37° C. La -
prueba se repitió hasta confirmar resultados satisfactorios.

La prueba de la temperatura se realizó, conciderándola como --
una técnica de selección, sensible a ciertas cepas amibianas. Para

su desarrollo se ocupó las cepas amibianas de mejor crecimiento, se sembró en medio N.N.E. por duplicado. incubando cada caja de Petri a las siguientes temperaturas 42 y 45°C, por un período de 24 horas cuidando la temperatura de incubación, se observó al microscopio -- invertido para ver si hubo o no crecimiento. En los casos que se -- manifestó, se prolongó hasta 96 horas y/o en su defecto se repitió -- la prueba hasta que fue confirmado que no hubo crecimiento.

7.- PRUEBA DE PATOGENICIDAD EN RATONES.

Se prepararon cultivos de cada una de las cepas amibianas cuatro días antes de la fecha de incubación. asegurando así su crecimiento óptimo. Se seleccionaron grupos de ratones de dos semanas de vida, los cuales fueron separados en jaulas. Grupo de 5 ratones -- por cepa y tipo de inoculación. El inóculo fue preparado, según -- descripción en el apéndice.

Se trasladó el material al bioterio, donde se efectuó la inoculación. La asepsia y manejo correcto del material de estudio fue fundamental, por lo que se trabajó tomando todas las medidas necesarias como: Uso de bata, gafas, guantes y solución de fenol al 3% -- para limpiar el área de trabajo y cualquier derrame de inóculo.

Se etiquetaron las jaulas con los datos e indicaciones generales siguientes: Prueba de patogenicidad (PPA), clave de la cepa, - vía de inoculación intranasal o intracerebral, fecha de inoculación número de ratón y jaula.

Inoculación intracerebral: Se preparó la jaula con inóculo -- amibiano, los ratones se adormecieron ligeramente en cámara con éter etílico, se efectuó la punción a nivel de la línea sagital y hueso parietal, administrando 0.02 ml de concentrado amibiano, y fue inmediatamente marcado en la cola, según clave de jaula, para poder ser identificado en caso de fuga. La inoculación se efectuó a grupos de 5 ratones por jaula y cepa. Al concluir la inoculación se dio de beber agua y se colocó la jaula en los estantes del área de roedores.

Inoculación intranasal: Se adormeció ligeramente al ratón, se tomó de las orejas para proceder a la inoculación (se eliminó la -- aguja), colocando dos gotas directamente a los orificios nasales -- para ser absorbidas durante la respiración del ratón. Los ratones se marcaron, procediendo agualmente al desarrollo en la inoculación intracerebral.

Los ratones se revisaron diariamente, anotando los datos en --

las hojas de registro, durante el seguimiento (21 días). De los -- animales muertos en ese período, se sembraron porciones del cerebro en N.N.E. de los ratones procedentes de la inoculación intracere-- bral. De los ratones de instilación intranasal fueron sembrados -- porciones de cerebro, pulmón, hígado y riñón en medio N.N.E., ano-- tando en cada caja la clave de la cepa, fecha de inoculación, número del ratón muerto y fecha de cultivo o siembra. Los ratones sobre-- vivientes fueron sacrificados al término del seguimiento, sembrán-- dose respectivamente los órganos, dependiendo de la vía de ino-- culación. Todos los cultivos de los órganos fueron incubados a 37°C y observados diariamente en el microscopio invertido, se hizo aisla-- miento y purificación de las amibas recuperadas de los órganos de los ratones muertos y/o sacrificados. Finalmente las cepas recupera-- das después de la inoculación IC e IN, fueron sembradas cada sema-- na para su identificación posterior.

8.- METODO DE IDENTIFICACION DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE

AISLADAS, POR MEDIO DE ISOELECTROENFOQUE EN AGAROSA (EFI).

Se realizó con las cepas recuperadas de las pruebas de patoge-- nidad, para ser identificadas y clasificadas hasta nivel taxonó-- mico de especie, mediante la obtención de extractos de las amibas y su corrimiento sobre el gel de agarosa (EFI) en un gradiente de pH.

Para esta prueba fueron sembrados tres tubos con cultivo de cada cepa en medio axénico e incubados a 30°C, por tres a cuatro días, una vez comprobado el crecimiento amibiano, se centrifugó a 2 500 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de cada tubo en uno solo. El concentrado de los tres tubos, fue centrifugado y enjuagado en tres ocasiones para la prueba de proteínas totales y un solo lavado para la prueba de isoenzimas. Se agregaron 30 ul de tritón 100X al 0.25% al concentrado amibiano y se congeló en estas condiciones hasta su utilización. La preparación del gel de agarosa fue realizado según descripción en la sección de medios de cultivo en el apéndice.

Una vez que fueron preparados los extractos amibianos de las cepas de referencia y por identificar (ver sección de material biológico en el apéndice), se procedió al corrimiento en el aparato.

Se aplicaron 20 ul de extracto sobre un trozo de papel filtro (aplicador de muestra) por cada cepa y fueron colocadas una a una sobre el gel en la región del ánodo (un cm retirado de la orilla) de la placa de corrimiento (ECPS-3000/150 electrophoresis constant power supply).

Concideraciones del corrimiento: Se conectó la fuente de poder

ajustada a un voltaje 1 500 voltios/hora y una corriente de 150 --- miliamperios y un poder de 15 vatios, además la fuente de poder se conectó a un integrador de voltaje (volhour integrator Vh. 1, ajustado a 1 700 voltios/hora).

Se dejó correr la enzima durante 45 minutos, al término de los cuales se retiraron los aplicadores de muestra del gel y nuevamente fue expuesto al corrimiento, el gel se reveló con los sustratos - - adecuados para la enzima específica.

Revelado de la enzima: En caso de enzima, el gel se colocó - directamente sobre el revelador enzimático y se incubó a 37°C, según las especificaciones y seguimientos de la enzima. El secado del -- gel se efectuó después que la enzima se hubo revelado.

Proteínas totales: Se hizo el corrimiento descrito anteriormente variando únicamente en el revelado. El gel de agarosa con el corrimiento de las muestras para proteínas totales, se sumergió en una solución fijadora durante 20 minutos, después de lo cual se -- lavó en dos ocasiones con solución desteñidora por 15 minutos cada una. Se procedió a secar colocándolo sobre la placa de nivelación para secado (papel absorbente, placa de vidrio y peso de 1 kg) por 15 minutos y posteriormente secado por aereción. Ya seco, se sumer

gío en colorante durante 8 minutos y nuevamente otros 17 minutos -- sobre solución decolorante hasta eliminación del exceso de color; y finalmente fue secado por aereación para su interpretación.

RESULTADOS.

Se obtuvieron 182 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR),-- 529 muestras de exudados nasales (EN) y 60 secreciones seropurulentas producidas en pacientes con quemaduras (SSQ). Durante el período comprendido entre el mes de enero de 1986 al mes de octubre del mismo año, provenientes de los siete centros hospitalarios elegidos (tabla no. 1).

Del estudio protozoológico se encontró: 9 muestras positivas para trofozoítos de amibas de vida libre en exudados nasales y 5 - muestras procedentes de secreciones seropurulentas producidas en - pacientes con quemaduras, haciendo un total de 14 muestras positivas (tabla No. 2).

Las muestras se tomaron en pacientes canalizados de clínicas de afiliación, a los centros hospitalarios de zona, del I.S.S.S.-T.E., cuyos antecedentes se describen (tabla No. 3)

La nomenclatura utilizada para cada una de las cepas amibianas aisladas de las muestras, se manejó a través de una clave (-- inicial del paciente), que permitió desarrollar más fácilmente el control de las amibas (tabla No. 4), correspondiendo una cepa amibiana aislada por cada muestra.

TABLA No. 1 .- MUESTREO EN SIETE CENTROS HOSPITALARIOS PARA EL AISLAMIENTO DE AMIBAS DE VIDA LIBRE.

HOSPITAL	L.C.R.	E.N.	S.S.Q.
H. G. Adolfo López Mateos	41	2	--
H. G. Darío Fernández	8	146	--
H. G. Fernando Quiroz	10	2	--
H. G. Ignacio Zaragoza	53	150	60
H. G. Primero de Octubre	11	26	--
H. G. 20 de Noviembre	46	203	--
C. M. La Raza	13	--	--
TOTAL.	182	529	60

TABLA No. 2 .- MUESTREO POSITIVO AL AISLAMIENTO DE AMIBAS DE VIDA LIBRE EN EXUDADOS NASALES Y SECRECIONES PURULENTAS EN PACIENTES CON QUEMADURAS.

HOSPITAL	EXUDADOS NASALES.	SECRECIONES PURULENTAS.
H. G. Darío Fernández	3	-
H. G. Ignacio Zaragoza	3	5
H. G. 20 de Noviembre	3	-
TOTAL	9	5

TABLA No. 3.- DATOS CLINICOS DISPONIBLES DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

PACIENTE	SEXO	EDAD	ANTECEDENTES A LA ENFERMEDAD.	SIGNOS Y SINTOMAS	DIAGNOSTICO PRESENTE	TRATAMIENTO.
C.G.E.	M	7	Individuo sano	Prurito, períodos de hipertermia, - exudado serológico y purulento.	Quemadura de segundo grado en región torácica anterolateral derecha.	Lavado, tepescohuite (polvo de la corteza de <u>Mimosa tenuiflora</u>).
G.A.G	M	4	Quemadura aguda de primer grado de 8 días con - infección local aguda en evolución.	Dolor local, incapacidad para la deambulación, -- edema, fiebre, -- secreción purulenta.	Quemadura de primer grado en el hombro.	lavado y debridación del absceso Penicilina y dicloxacilina.
R.J.M.	F	11	Individuo sano.	Dolor local, edema prurito, eritema, hipertermia.	Quemadura de primero y segundo grado en la región torácica -- (después de broncearse al sol) combinado con la natación en - piscina.	Penicilina Dicloxacilina lavados.

TABLA No. 3.- DATOS CLINICOS DISPONIBLES DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

PACIENTE	SEXO	EDAD	ANTECEDENTES A LA ENFERMEDAD	SIGNOS Y SINTOMAS	DIAGNOSTICO PRESENTE	TRATAMIENTO	ANALISIS CLINICOS.	
B.B.J	M	24	Gripas frecuentes faringitis, amigdalitis.	Cefalea intermitente tos aguda con esputo purulento.	Faringoamigdalitis	Penicilina Dicloxacilina Gentamicina.	Cultivo de exudado faríngeo abundante <u>Neisseria sp</u> no hemolítico. Exudado nasal derecho. <u>Staphylococcus sp</u> coagulasa negativa. Exudado nasal izquierdo. abundante <u>Staphylococcus aureus</u> .	
C.T.D.	F	38	Gripas frecuentes	Rinorrea hialina, - cefalea frontal, -- periodos de hipertermia.	Sinusitis	Amoxicilina Trimetropim con Sulfametoxazol.		
P.D.J.	F	5	NO HAY DATOS DISPONIBLES.					

TABLA No. 3.- DATOS CLINICOS DISPONIBLES DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

PACIENTE	SEXO	EDAD	ANTECEDENTES A LA ENFERMEDAD	SIGNOS Y SINTOMAS	DIAGNOSTICO PRESENTE	TRATAMIENTO	ANALISIS CLINICOS.
L.A.E.	M	9	Individuo sano	Edema local, prurito exudado purulento, - dolor incapacidad -- funcional, eritema.	Quemadura de la piel infectada.	lavado, debridación, vacunación antitetánica, -- Dicloxacilina.	
D.R.R.	M	45	Faringoamigdalitis	Cefalea, períodos de hipertermia, vómito.	traumatismo facial agudo, re-- gión derecha, - fractura con -- desviación septal aguda, faringitis repetitiva.	Cirugía nasal reconstructiva.	Exudado nasal derecho: <u>Staphylococcus sp.</u> -- coagulasa negativa <u>Corynebacterium sp.</u> Exudado nasal izquierdo: <u>Staphylococcus aureus</u> y <u>Neisseria sp.</u>
R.M.M.	M	5					
NO HAY DATOS DISPONIBLES.							
P.H.S.	M	6	Individuo sano	Dolor local, edema prurito, pústulas, secreción purulenta.	Quemadura química de segundo grado en la región inter na del brazo.	lavado con Benzal e Isodine.	

TABLA No. 3.- DATOS CLINICOS DISPONIBLES DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

PACIENTE	SEXO	EDAD	ANTECEDENTES A LA ENFERMEDAD	SIGNOS Y SINTOMAS	DIAGNOSTICO PRESENTE	TRATAMIENTO	ANALISIS CLINICOS.
R.V.A.	M	30	Sinusitis crónica desviación septal al lado izquierdo.	Rinalgia, rinodema	Desviación septal no obstructiva, - no quirúrgica, si- nusitis maxilar - crónica.	gentamicina	
T.G.H.	M	23	Sinusitis, rinitis aguda catarral.	Cefalea, rinorrea purulenta, períodos de hipertermia.	Sinusitis, Maxilar derecha y rinitis crónica.	Pseudoefedrina	Cultivo de exudado nasal: "flora normal" Eosinófilos en mucosa -- nasal: negativo.
A.S.C.	M	8	Faringitis, amigda- litis.	Odinofagia	Faringoamigdalitis	Penicilina	Cultivo de exudado nasal: <u>Neisseria sp.</u> <u>Streptococcus sp.</u> , <u>E. coli</u> <u>Staphylococcus aureus.</u>
A.R.J.	M	25	Sinusitis gripal rinitis crónica.	Cefalea intermitente rinorrea purulenta.	Rinofaringitis Sinusitis.		

TABLA No. 4 .- DATOS GENERALES SOBRE EL TRATAMIENTO DE LAS CEPAS AMIBIANAS, DEL MUESTREO REALIZADO EN PACIENTES -- CON RINITIS CRONICA E INFECCIONES SECUNDARIAMENTE PRODUCIDAS EN PACIENTES CON QUEMADURAS.

CEPA AMIBIANA	EDAD	TIPO DE MUESTRA	FECHA DE MUESTREO	FECHA DE AISLAMIENTO
B.B.J.	24	Exudado nasal	06-febrero-86	11-febrero-86
C.T.D.	38	Exudado nasal	10- marzo -86	15- marzo -86
P.D.J.	5	Exudado nasal	05- agosto-86	07- agosto-86
R.V.A.	30	Exudado nasal	14- abril -86	21- abril -86
R.M.M.	5	Exudado nasal	05- marzo -86	15- marzo -86
T.G.H.	23	Exudado nasal	10- marzo -86	17- marzo -86
L.A.E.	9	Secreción de Quemadura	20- junio -86	27- junio -86
A.S.C.	8	Exudado nasal	07- julio -86	11- julio -86
C.G.E.	7	Secreción de Quemadura	25- mayo -86	05- junio -86
P.H.S.	6	Secreción de Quemadura	14- abril -86	22- abril -86
G.A.G.	4	Secreción de Quemadura	16- julio -86	20- julio -86
D.R.R.	45	Exudado nasal	08- junio -86	13- junio -86
A.R.J.	25	Exudado nasal	13- junio -86	17- junio -86
R.J.M.	11	Secreción de Quemadura	16-octubre-86	21-octubre-86

AXENIZACION DE LAS CEPAS AMIBIANAS EN MEDIO SCGYEM MODIFICADO Y MORFOMETRIA.

Al primer intento de axenización, se logró el crecimiento de cada una de las cepas amibianas aisladas en el medio SCGYEM modificado, lo que permitió realizar la morfometría del quiste y trofozoíto a un grupo de 50 microorganismos de cada cepa amibiana, siendo necesario mencionar que la morfometría fue completada con preparaciones teñidas con la técnica de Hematoxilina_Gomori (Cerva, 1986).

Las amibas presentaron un tamaño que varió de 23.9 a 38.9 μm por 14.1 a 17.9 μm para los trofozoítos y de 14.3 a 18 μm para los quistes (tabla No. 5).

Tanto los trofozoítos redondeados como los alargados, presentaron acantópodos característicos del género Acanthamoeba (fotografía 1A, 2A y 3A).

Los quistes mostraron una doble pared en donde la hoja interna o endoquiste presentó forma poliédrica o bien forma redondeada (fotografía 1B, 2B y 3B), la hoja externa o exoquiste siguió el contorno que el endoquiste en todas las cepas, sólo que en los quistes -- maduros exhibió una forma rugosa con ondulaciones o pliegues irregulares carcterísticos del género Acanthamoeba.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS AMIBIANAS AISLADAS.

De las catorce cepas amibianas aisladas, cuando se inoculó por vía intracerebral siete cepas mostraron la capacidad de matar al 60 % o más de los ratones utilizados en la prueba, cinco cepas produjeron un % menor de mortalidad pero se logró recuperar a las amibas a partir de ratones sacrificados, después de 21 días de experimentación: y sólo dos cepas no mostraron patogenicidad alguna (tabla No. 6).

De la prueba de instilación nasal de las cepas amibianas aisladas sólo se manifestó patogenicidad en dos cepas con mortalidad al 60% y en seis cepas con mortalidad del 20 al 40% (tabla No. 7). También se logró recuperar las amibas inoculadas por esta vía a partir de los órganos afectados.

Para complementar los estudios sobre la morfología y las pruebas de patogenicidad de las amibas aisladas y con esto lograr la -- identificación de las mismas hasta nivel de especie, se realizaron pruebas bioquímicas que consistieron en determinar el patrón isoenzimático de la fosfatasa ácida, alcohol deshidrogenasa y propionil-esterasa. Así como el patrón de proteínas totales. Los resultados fueron comparados con los patrones obtenidos con las cepas de referencia.

Debido a que el sistema de revelado utilizado en los diferentes corrimientos no permitieron obtener fácilmente una impresión fotográfica, los resultados de dichos corrimientos se presentan a continuación en forma esquemática.

Utilizando los resultados obtenidos por isoelectroenfoque, las pruebas de patogenicidad y las características morfológicas se llegó a la identificación hasta especie de las cepas ambientales aisladas, -elaborándose un resumen que aparece en la tabla No. 8.

TABLA No. 5 .- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CEPAS AMIBIANAS DEL
 GENERO Acanthamoeba sp. AISLADAS.

CEPA AMIBIANA	TROFOZOITO (MEDIA) * um	QUISTE (MEDIA) * um	IDENTIFICACION MORFOLOGICA
B.B.J.	38.9 x 17.9	16.9	<u>Acanthamoeba</u> sp.
C.T.D.	28.8 x 16.0	14.3	<u>Acanthamoeba</u> sp.
P.D.J.	26.9 x 14.5	15.7	<u>Acanthamoeba</u> sp.
R.M.M.	30.9 x 14.1	15.8	<u>Acanthamoeba</u> sp.
R.V.A.	28.3 x 17.3	14.3	<u>Acanthamoeba</u> sp.
T.G.H.	33.9 x 16.6	15.6	<u>Acanthamoeba</u> sp.
L.A.E.	31.3 x 20.5	15.1	<u>Acanthamoeba</u> sp.
C.G.E.	23.9 x 15.2	16.3	<u>Acanthamoeba</u> sp.
A.S.C.	28.1 x 17.4	15.8	<u>Acanthamoeba</u> sp.
P.H.S.	29.7 x 15.9	15.5	<u>Acanthamoeba</u> sp.
G.A.G.	27.8 x 17.7	16.3	<u>Acanthamoeba</u> sp.
D.R.R.	34.0 x 20.5	17.9	<u>Acanthamoeba</u> sp.
A.R.J.	31.2 x 20.9	14.9	<u>Acanthamoeba</u> sp.
R.J.M.	26.8 x 16.6	15.3	<u>Acanthamoeba</u> sp.

(*) MEDIA DE 50 MICROORGANISMOS.

TABLA No. 6 .- PRUEBA DE PATOGENICIDAD Y REAISLAMIENTO DE LAS CEPAS AMIBIANAS
DEL GENERO Acanthamoeba INOCULADAS INTRACEREBRALMENTE EN RATON.

CEPA AMIBIANA	No. DE AMIBAS INOCULADAS	No. DE RATONES MUERTOS	DIA DE MUERTE DE CADA RATON	RECUPERACION DE LA CEPA EN N.N.E. A PARTIR DE CEREBRO.	RECUPERACION DE LA CEPA EN CULTIVO SCGYEM.
B.B.J.	25 000	1/5	7,21,21,21,21.	-	-
C.T.D.	23 000	2/5	14,19,21,21,21.	+	+
P.D.J.	35 000	1/5	17,19,21,21,21.	+	+
R.V.A.	30 000	0/5	21,21,21,21,21.	+	+
R.M.M.	29 000	4/5	1, 1, 3, 4,21.	+	+
T.G.H.	33 000	1/5	2,21,21,21,21.	+	+
L.A.E.	13 000	3/5	7,11,13,21,21.	+	+
A.S.C.	14 000	2/5	1, 7,21,21,21.	+	+
C.G.E.	5 300	3/5	4, 7,14,21,21.	+	+
P.H.S.	6 400	0/5	21,21,21,21,21.	-	-
G.A.G.	11 000	3/5	8,11,11,21,21.	+	+
D.R.R.	11 500	3/5	6, 7,10,21,21.	+	+
A.R.J.	6 500	5/5	2, 3, 3, 4, 4.	+	+
R.J.M.	7 200	5/5	2, 4, 4, 6,10.	+	+

TABLA No. 7 .- PRUEBA DE PATOGENICIDAD Y REAISLAMIENTO DE LAS CEPAS AMIBIANAS DEL GENERO Acanthamoeba INOCULADAS POR INSTILACION INTRANASAL EN RATONES.

CEPA AMIBIANA	No. DE AMIBAS INOCULADAS	No. DE RATONES MUERTOS	DIA DE MUERTE DE CADA RATON	RECUPERACION DE LAS CEPAS EN N.N.E. A PARTIR DE -- CEREBRO/PULMON/RIÑON/HIGADO				RECUPERACION DE LA CEPA - EN CULTIVO - SCGYEM.
B.B.J.	25 000	0/5	21,21,21,21,21.	-	-	-	-	-
C.T.D.	10 000	3/5	3, 4, 7,21,21.	+	+	+	+	+
P.D.J.	7 500	1/5	14,21,21,21,21.	+	+	+	+	+
R.V.A.	20 000	1/5	14,21,21,21,21.	+	+	-	-	+
R.M.M.	8 450	0/5	21,21,21,21,21.	+	+	-	-	+
T.G.H.	23 000	2/5	4,15,21,21,21.	+	+	+	+	+
L.A.E.	13 000	1/5	9,21,21,21,21.	+	+	-	-	+
A.S.C.	14 000	2/5	1,21,21,21,21.	-	+	-	-	+
C.G.E.	6 300	3/5	4, 7,14,21,21.	-	+	-	-	+
P.H.S.	5 400	0/5	21,21,21,21,21.	-	-	-	-	-
G.A.G.	11 000	2/5	14,14,21,21,21.	-	+	-	-	+
D.R.R.	11 000	0/5	21,21,21,21,21.	-	-	-	-	-
A.R.J.	6 500	0/5	21,21,21,21,21.	+	+	+	-	+
R.J.M.	7 200	0/5	21,21,21,21,21.	+	+	-	-	-

TABLA No. 8 .- RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, PRUEBAS DE PATOGENICIDAD
E IDENTIFICACION A NIVEL DE ESPECIE DE LAS CEPAS AMIBIANAS AISLADAS.

CEPA AMIBIANA	EDAD (AÑOS)	TIPO DE MUESTRA	TROFOZOITO (MEDIA) um	QUISTE (MEDIA) um	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD		IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES.
					I.C.	I.N.	
B.B.J.	24	EXUDADO NASAL	38.9 x 17.9	16.9	-	-	<u>A. palestinensis.</u>
C.T.D.	38	EXUDADO NASAL	28.8 x 16.0	14.3	+	+	<u>A. polyphaga.</u>
P.D.J.	5	EXUDADO NASAL	26.9 x 14.5	15.7	- ^a	- ^a	<u>A. polyphaga.</u>
R.M.M.	5	EXUDADO NASAL	30.9 X 14.1	15.8	+	- ^a	<u>A. lugdunensis.</u>
R.V.A.	30	EXUDADO NASAL	28.3 x 17.3	14.3	- ^a	- ^a	<u>A. polyphaga.</u>
T.G.H.	23	EXUDADO NASAL	33.9 x 16.6	15.6	- ^a	- ^a	<u>A. divionensis.</u>
A.S.C.	8	EXUDADO NASAL	28.1 x 17.4	15.8	- ^a	- ^a	<u>A. lugdunensis.</u>
D.R.R.	45	EXUDADO NASAL	34.0 x 20.5	17.9	+	-	<u>A. mauritaniensis.</u>
A.R.J.	25	EXUDADO NASAL	31.2 x 20.9	14.9	+	^a	<u>A. rhyodes.</u>
L.A.E.	9	QUEMADURA	31.3 x 20.5	15.1	+	- ^a	<u>A. mauritaniensis.</u>
C.G.E.	7	QUEMADURA	23.9 x 15.2	16.3	+	+	<u>A. mauritaniensis.</u>
P.H.S.	6	QUEMADURA	29.3 x 15.9	15.3	-	-	<u>A. palestinensis.</u>
G.A.G.	4	QUEMADURA	27.8 x 17.7	16.5	+	- ^a	<u>A. mauritaniensis.</u>
R.J.M.	11	QUEMADURA	26.8 x 16.6	15.3	+	-	<u>A. polyphaga.</u>

+ = Patogenicidad del 60 % o más.

- = Patogenicidad menor del 60 %.

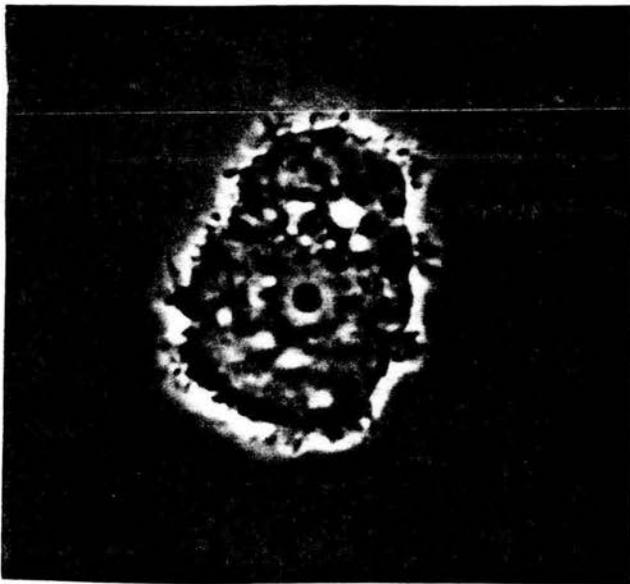
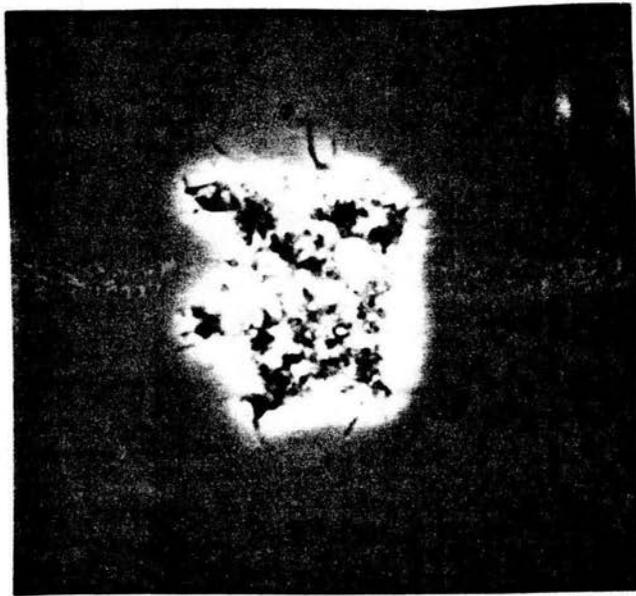
a = Recuperación después del sacrificio a los 21 días.

X̄ = Media de 50 microorganismos.

I.C. = Intracerebral.

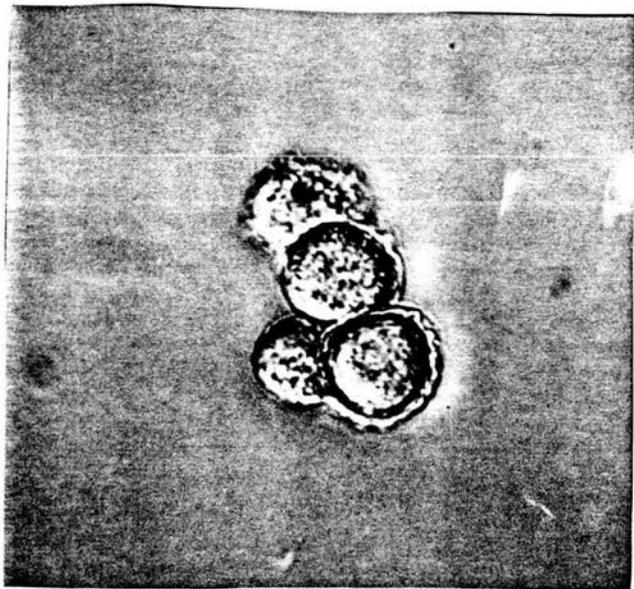
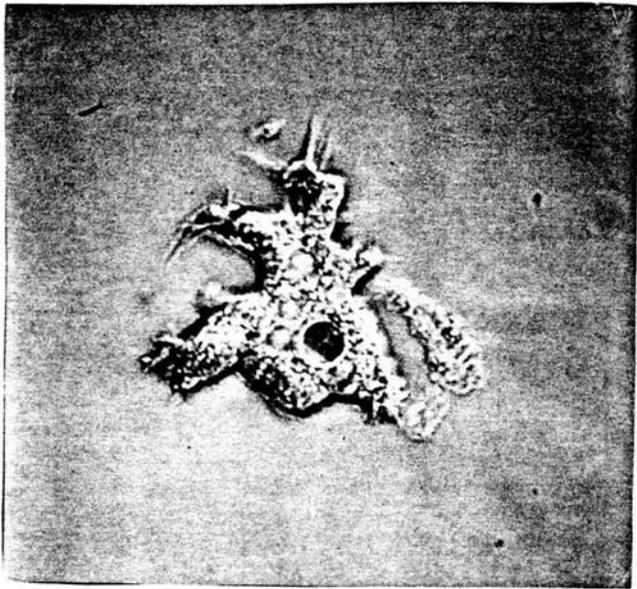
I.N. = Intranasal.

Fotografía No. 1A.
TROFOZOITO DE
Acanthamoeba sp.
(CEPA C.T.D.)
640x.



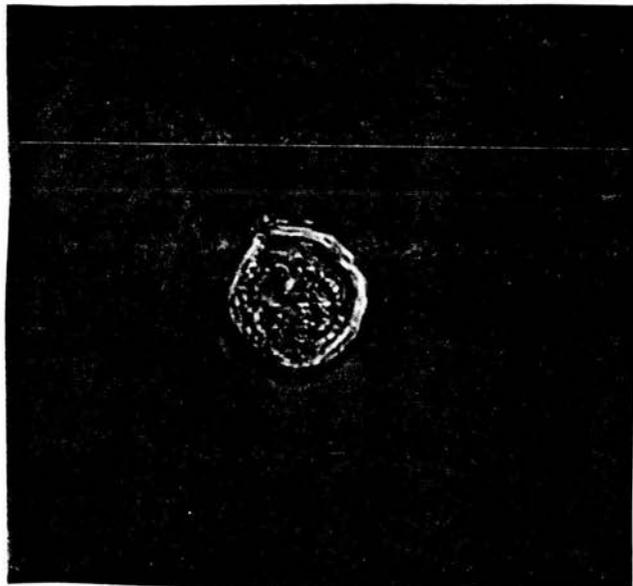
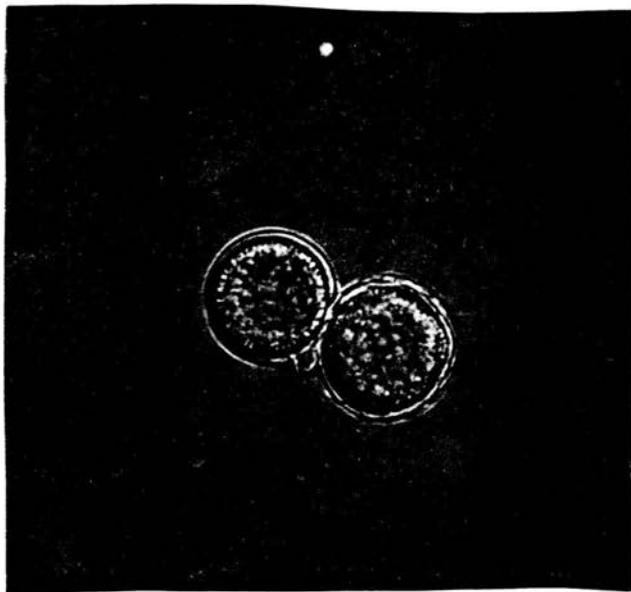
Fotografía No. 2A.
TROFOZOITO DE
Acanthamoeba sp.
(CEPA R.V.A.)
640x.

Fotografía No. 3A.
TROFOZOITO DE
Acanthamoeba sp.
(CEPA C.T.D.)
640x.

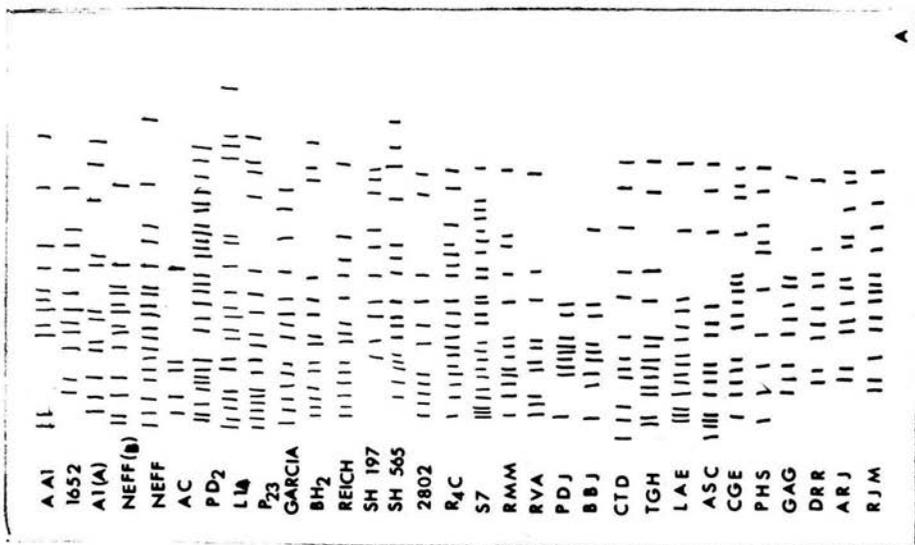


Fotografía No. 1B.
QUISTE DE
Acanthamoeba sp.
(CEPA C.T.D.)
640x.

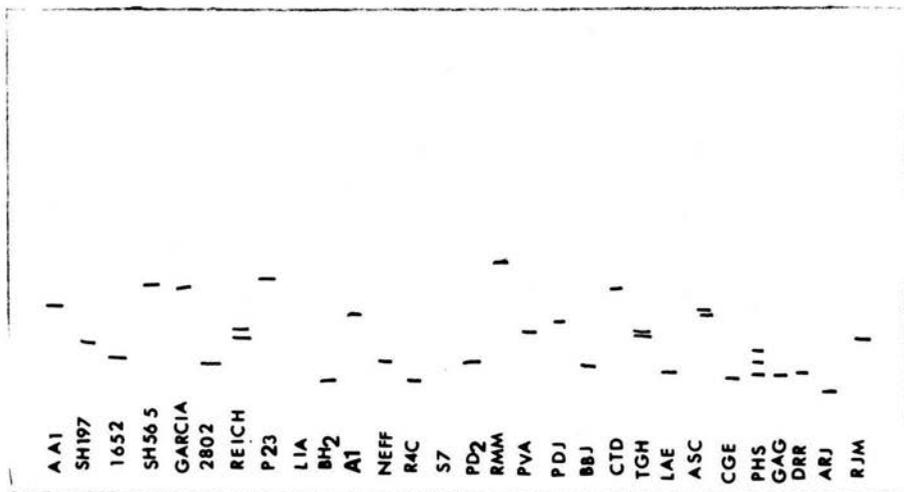
Fotografía No. 2B.
QUISTE DE
Acanthamoeba sp.
(CEPA T.G.H)
640x.



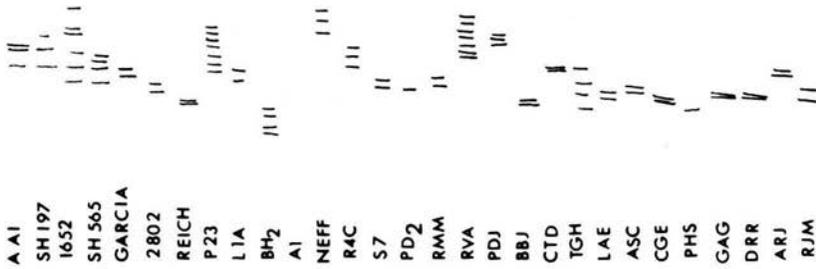
Fotografía No. 3B.
QUISTE DE
Acanthamoeba sp.
(CEPA R.M.M.)
640x.



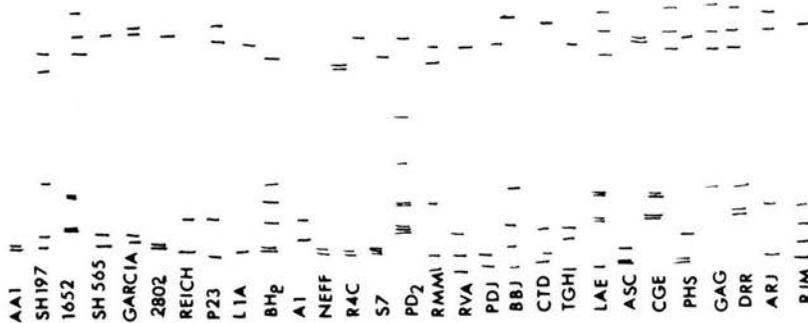
Esquema No. 1. - PATRON DE CORRIMIENTO PARA PROTEINAS TOTALES DE CEPAS DE Acanthamoeba AISLADAS Y DE REFERENCIA.



Esquema No. 2. - PATRON DE CORRIMIENTO PARA LAS ISOENZIMAS DE FOSFATASA ACIDA DE CEPAS DE Acanthamoeba AISLADAS Y DE REFERENCIA.



Esquema No. 3.- PATRON DE CORRIMIENTO PARA LAS ISOENZIMAS DE ALCOHOL DESHIDROGENASA DE LAS CEPAS DE Acanthamoeba sp. AISLADAS Y DE REFERENCIA.



Esquema No. 4.- PATRON DE CORRIMIENTO PARA LAS ISOENZIMAS DE PROPIONIL ESTERASA DE LAS CEPAS DE Acanthamoeba AISLADAS Y DE -- REFERENCIA.

DISCUSION.

De las 182 muestras de líquido cefalorraquídeo estudiadas, ninguna resultó positiva para el aislamiento de estas amibas y esto se puede explicar por la baja probabilidad de aislamiento que existe, ya que hasta 1987 sólo habían sido reportados 182 casos de MEAP y EAG a nivel mundial y la mayoría diagnosticados retrospectivamente. Por otro lado, debemos de tomar en cuenta que el estudio se hizo en líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningoencefalitis de etiología a determinar y sabemos que la mayoría de los casos de meningoencefalitis son de origen viral y los siguientes en frecuencia son de origen bacteriano. Sin embargo, -- creemos que es importante continuar con la búsqueda de estas amibas en este tipo de muestras, para tratar de lograr un diagnóstico y tratamiento oportuno ya que cabe mencionar que, durante este período, se reportó un caso de MEAP en el hospital de pediatría de esta ciudad, cuyo diagnóstico fue retrospectivo y sin que se lograra el aislamiento de la amiba (Martínez, 1987, López Corella et al., 1986).

Durante el mismo período en que se revisaron los líquidos -- cefalorraquídeos se estudiaron un total de 529 exudados nasales -- provenientes del servicio de otorrinolaringología de los diferen-

tes centros hospitalarios. El tipo de muestra y el acceso más fácil a los pacientes explica por qué el número es casi tres veces mayor que el obtenido para los líquidos cefalorraquídeos. De los exudados nasales, 9 resultaron positivos para el aislamiento de amibas del género Acanthamoeba, lo que correspondió al 1.7 %. -- Este resultado es menor al obtenido por Skocil y colaboradores -- (1972) en Checoslovaquia, donde se reportó una frecuencia del 5 % al realizar un estudio en comunidades militares. Además, encontraron que la frecuencia varió con respecto a la localización geográfica de la comunidad estudiada dentro de ese país. Un resultado similar fue el encontrado por Abraham y Lawande (1982) que fue del 4.2 %, aunque en su estudio, incluyeron a individuos sanos de diferentes edades.

Las razones que explicarían esta incidencia menor de aislamiento entre los pacientes que viven en la Cd. de México, no son muy claras. Probablemente la contaminación atmosférica de la ciudad puede estar directamente o inversamente involucrada en la incidencia de la viabilidad de los quistes de las amibas de vida libre y así indirectamente relacionadas a la disminución de la posibilidad de contaminación de los pasajes nasales por estas amibas. Sin embargo, esto necesita mayor apoyo, por lo que sentimos que es necesario una búsqueda sistemática para determinar-

la incidencia de quistes viables y la posible influencia de algunas variables meteorológicas y contaminantes, en la atmósfera de la Cd. de México, además de realizar un estudio semejante al que realizamos, en otras regiones geográficas del país donde las condiciones ambientales son diferentes, a fin de tener datos comparables.

De los 9 aislamientos a partir de exudados nasales, 8 resultaron ser patógenos para animales de laboratorio, obteniéndose con esto un dato que sugeriría la posible participación de estas amibas en el proceso infeccioso. Sin embargo, aún no se ha podido comprobar la participación directa de estos microorganismos de vida libre en las patologías de la mucosa nasal de los pacientes en los que se han llevado a cabo los aislamientos y por ello pueda asegurarse que sean los únicos responsables de la patología que aqueja al paciente aunque ha quedado perfectamente demostrado el poder citopático de la mayoría de las especies de este género (Skocil et al., 1972).

Para este trabajo la información clínica fue insuficiente en datos que pudieran ayudar a establecer un nexo directo entre las amibas aisladas y la patología del paciente, encontrándose que en algunos casos se carecía de expediente clínico lo cual aunado a la imposibilidad de seguir de cerca la evolución del paciente desde su ingreso hasta su alta, impidió una correlación completa entre -

los parámetros biológicos (amibas aisladas), los clínicos (signos y síntomas de cada paciente), y el tratamiento recibido según el caso.

La búsqueda de esos microorganismos se dirigió también a pacientes con quemaduras, los cuales manifestaban infecciones debajo de la costra de cicatrización por lo que se realizaron muestreos para aislar amibas de vida libre obteniéndose 5 aislamientos de amibas pertenecientes al género Acanthamoeba de las cuales 4 resultaron patógenas para animales de laboratorio. Los resultados obtenidos sólo permiten asociar estos microorganismos a la infección, sin afirmar que sean los únicos directamente involucrados en la patología. Estos pacientes fueron tratados con antibióticos de amplio espectro como penicilina y dicloxacilina, con lo cual la infección cedió fácilmente, lo que no sucede en las infecciones producidas por amibas del género Acanthamoeba en pacientes crónicamente debilitados o inmunosuprimidos. Es muy probable que estas amibas hayan sido eliminadas de la lesión por quemadura gracias a la debridación de la zona abscedada y a los lavados mecánicos enérgicos practicados. Para explicar la presencia de estas amibas en las lesiones de quemadura infectadas es importante considerar el hecho de que estas amibas han sido aisladas de diferentes fuentes acuíferas e inclusive del aire (Rivera et al., 1988), además de que en

la mayoría de los pacientes se hicieron curaciones caseras en condiciones de asepsia dudosa. Así mismo, algunos pacientes fueron tratados con el polvo obtenido de la corteza de Mimosa tenuiflora que no recibió ningún tratamiento antes de su aplicación.

En cuanto a cómo se llevó a la identificación hasta especie de las amibas, es importante mencionar que fue necesario tomar en cuenta el criterio morfológico, de patogenicidad y bioquímico debido a la gran variabilidad que se presenta en este tipo de amibas. Así, la morfología sólo nos ayuda para llegar hasta género y ubicar las cepas por identificar, en algunos de los tres grupos propuestos por Pussard y Pons (1977) que están basados en la forma y tamaño del quiste. Las pruebas de patogenicidad ayudan bastante para ubicar nuestros aislamientos dentro de las cepas patógenas de cada grupo, pero de nuevo, como es bien sabido, todas las pruebas en las que se utilicen animales de laboratorio nunca son ciento por ciento reproducibles. Por esta razón el empleo de pruebas bioquímicas como el isoeléctroenfoco de isoenzimas y proteínas totales resulta ser de gran ayuda en la identificación específica, aunque este último criterio de identificación por sí sólo no sería definitivo ya que aunque algunas especies presentan zimogramas muy constantes, otras exhiben variaciones en los patrones isoenzimáticos (zimodemas), que hacen más difícil el diagnóstico hasta el nivel de especie.

De esta manera tomando en cuenta la morfología, la prueba de -
patogenicidad, el resultado de al menos dos zimogramas de las tres
enzimas y el corrimiento de proteínas totales que se utilizaron en
la identificación de Acanthamoeba, se llegó al establecimiento de
especie.

CONCLUSIONES.

Se aislaron 14 cepas de amibas de vida libre pertenecientes al género Acanthamoeba asociadas a patologías en humanos.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad revelaron -- que 12 de las cepas aisladas, presentaron diferentes grados de - virulencia para animales de laboratorio, sugiriendo la posible - participación en el padecimiento, sin conciderarlas como las di- rectamente responsables en las patologías.

El porcentaje de aislamiento en pacientes con rinitis cróni- ca fue menor al reportado por otros autores por lo que se sugiere realizar estudios donde se relacione la viabilidad de las formas- quísticas (diseminación) y los contaminantes atmosféricos de la - Cd. de México. Además de repetir el estudio realizado por noso - tros, en otras regiones geográficas del país para tener mayor in- formación sobre la frecuencia de estas amibas en pasajes nasales.

Para llegar a la identificación específica de este tipo de - amibas es necesario tomar en cuenta el criterio morfológico, las- pruebas de patogenicidad y el criterio bioquímico, considerando - que ninguno de los criterios en forma aislada, proporciona la con- fiabilidad necesaria para llegar al diagnóstico de especie.

SUGERENCIA.

Aun cuando no se logró aislamiento de amibas de vida libre a partir de líquido cefalorraquídeo de los pacientes estudiados, es importante continuar con la búsqueda de dichos protozoos a la vez de concientizar al personal médico, de que si bien la frecuencia de MEAP y EAG es baja, el diagnóstico y tratamiento oportuno evitaría la consecuencia que generalmente es fatal.

B I B L I O G R A F I A .

- Abraham, S.N. y Lawande, R.V. 1982. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, -- Nigeria. J. Trop. Med. & Hyg. 85 (5): 217-222.
- Anderson, K., Jamieson, A. 1972. Agglutination test for the investigation of the genus Naegleria. Pathology 1: 273.
- Butt, C. 1966. Primary amoebic meningoencephalitis. N. Engl. J. Med. 274: 1473-1476.

- Cain, A. R., Mann, P.G., Warhurst, D. C. 1979. Ig A primary amoebic meningoencephalitis. Lancet 1:441.
- Cain, A. R., Wiley, P. F., Brownell, D. B., Wahurst, D.C. 1981. A -- fatal case of primary amoebic meningoencephalitis. Arch. Dis. Child. 56:140-143.
- Carter, F.R. 1968. Primary meningoencephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. J. Pathol. Bacteriol. 96.:1-25.
- Carter, F.R. 1970. Description of Naegleria sp. isolated from two -- cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of -- the experimental changes induced by it. J. Pathol. 100: 217-244.
- Carter, R.F. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of the present knowledge. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66:193-213.
- Carter, R.F., Cullity, G.J., Ojeda, V.J., Silberstein, P, Willaert, E. 1981. A fatal case of meningoencephalitis due to a free-living amoeba of uncertain identity-probable -- Acanthamoeba spp. Pathology 13:51-68.

- Cerva, L. 1986. Laboratory method for the detection of Naegleria fowleri in clinical materials and environmental samples. Memorias del IV curso y simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación. UNAM. México. del 1 al 5 de Diciembre: 172-180.
- Chang, S.L. Healy, G.R., McCabe, L., Shumaker, J.B., Schultz, M.G.-- 1975. A strain of pathogenic Naegleria isolated from a human nasal swab. Health. Lab. Sci. 12:1-7.
- De Jonckheere, J.F. 1978. Quantitative study of Naegleria fowleri in surface water. Prostitologica 14:475-481.
- De Jonckheere, J.F. 1984. Notes of the postgraduate course on biochemical techniques for the diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. E N.E.P.I. U.N.A.M. México - 1-70.
- Dos Santos, J.G.M. 1970. Fatal primary amoebic meningoencephalitis A retrospective study in Richmond, Virginia. Am. J. Clin. Pathol. 54:737.

- Duma, R.J., Ferrel, W.H., Nelson, E.C., Jones, M.M. 1969. Primary-amoebic meningoencephalitis. N. Engl. J. Med. 24:1315-1323.
- Fulton, C. 1983 Macromolecular synthesis during quick change act of Naegleria. J. Protozool. 30:192-198.
- Kingston, D. and Warhurst, D.C. 1969. Isolation of amoebic from -- the air. Med. Microbiol. 2:27-36.
- Lawande, R.V., Abraham, s.N., John, I., Egler, L.J. 1979. Recovery of soil amebas from nasal passage of children during the dusty Harmattan Period in Zaira. Am. J. Clin. Pathol. 71:201-203.
- Lawande, R.V., MacFarlane, J.T., Weir, W.R.C. Awunor. Renner, C. -- 1980. A case of primary amoebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:21-25.
- Levine, N.F., Corliss, J.O., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Merinfeld, E.-G., Sprague, V., Vaura, J., Wallace, F.C. 1980. A - - newly revised classification of protozoa. J. Protozool. 27 (1):27-58.

- López Corella, E., De León, B.B. y De Jonckheere, J.F. 1986. Meningoencefalitis amibiana primaria en un adolescente de Huetamo, Michoacán. Memorias del IV Curso y Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación UNAM. México. p.20.
- Martínez, A.J., Dos Santos, J.G., Nelson, E.C., Stamm, W.P., Willaert, E. 1977. Primary amebic meningoencephalitis. In: Sommers S.C. Rosen, PP. eds. Pathology annual. New York: Appleton-Century Croft 12 (2): 225-255.
- Martínez, A.J. 1982 Acanthamoebiasis and immunosuppression case report. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 41:-- 548-557.
- Martínez, A.J. 1983. Free-living amoebae; pathogenic aspect. A review. Protozool. Abst. 8:293-306.
- ✶ Martínez, A.J. 1986. Meningoencefalitis producida por amibas del grupo Naegleria-Acanthamoeba y E. histolytica. VI Coloquio de Investigación en Ciencias de la Salud y el Medio Ambiente y la Educación., U.N.A.M., México. pp. 184-247.

Nelson, E.C. 1972. Procedures for the isolation pathogenic Naegleria
(Abst.). Virginia Journal of Science 23: 145.

Page, F.C. 1966 Taxonomical criteria for small amoebae with a redefinition of the genera Harmannella and Acanthamoeba and descriptions of three new species. ph D. Thesis, University of Wisconsin.

Page, F.C. 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae.-
freshwater Biological Association Scientific Publication
No. 34, Titus Kendal, England, p. 1-155.

Pussard, M. and Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et
taxonomie du genere Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida)-
Protistologica. 13(4): 557- 598.

Rico-Ferrat, G. y López-Ochoterena, E. 1976. Aspectos biológicos de
los protozoarios de las aguas negras de la zona metropolitana de la Cd. de México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.

- X Rivera, F., M.E., López-Ochoterena, E. 1978. transformación amebo-flagelar espontánea e inducida en especies del género Naegleria, Alexeieff (1912) recolectadas en piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la -- Cd. de México. Arch. Mex. Anat. 15 (10):9.
- Rivera, F., Medina, F., Alcocer, J., Vilaclara, G. and Robles, E., 1984. Pathogenic and free-living protozoa cultured the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. Environ. Res. 33:428-440.
- Rivera, F., Romero, R. Lares., Xóchihua, L., Reyes, J.L. 1985. Amibas de vida libre aisladas en pacientes pediátricos con -- rinitis crónica. Resumen del XVI Congreso Nacional de Microbiología. Durango, Dgo. pp.79.
- X Rivera, F., Rosas, I., Roy-Ocotla, G., Ramírez, E., Bonilla, P., -- Lares, F., 1985. Amibas aisladas de la Atmósfera de la ciudad de México. Resumen del XVI Congreso Nacional de Microbiología. Durango, Dgo.

Rivera, F., V.F., De Jonckheere, J. F., Bonilla, P. y Xóchihua, L. -
1986. Aislamiento de una especie de amiba de vida libre
no patógena del líquido cefalorraquídeo de un infante.-
Memorias del IV Curso y Simposio Internacional sobre -
Biología de la Contaminación. ENEPI. UNAM. México. p. 36.

Rivera, f., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P., - -
Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere -
of Mexico City and Environs. Environmental Research. 42:
149-154.

Rivera, F., Lares, F., Bonilla, P., Ramírez, P., y Paulín, A. 1988.
Pathogenic Amoebae Isolated from The Atmosphere of - -
México City and Environs. Proceed. Int. Conference ---
Hazardous Waste, Budapest, Hungary.

X Rodríguez, E. P. 1984. Meningoencefalitis por N. fowleri: informe de
un caso. Infectología. 4(10):263-266.

Skocil, V., Cerva, L., and Serbus, C. 1970. Epidemiological study of
amoebas of the limax group in military communities. --
first Report. J. Hyg. Epidemiol. 14:61-66

- Skocil, V., Serbus, C., and Cerva, L., 1972. Epidemiological study -
of incidence of amoebae of the limax group in nasal --
swabs and some epidemiological indices. J. Hyg. Epidemiol.
16:226-230.
- Stevens, A. R., R. L. Tyndall, C.C. Coutant, and E. Willaert. 1977. -
Isolation of the etiological agent of primary amoebic --
meningoencephalitis from artificially heated waters. --
Appl. Environ. Microbiol. 34:701-705.
- Tomasini-Ortiz, P., and López-Ochoterena, E. 1979. Análisis taxónomico
de las especies de protozoarios encontrados en el agua-
potable de la ciudad de México. Rev. Latinoamer. Microbiol.
21:147-151.
- Valenzuela, G.A., E. López-Corella and De Jonckheere, J. F. 1984 - -
Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from
northwestern México. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. --
8*:558-559.

A P É N D I C E

MATERIAL BIOLÓGICO.

- 1.- Líquido Cefalorraquídeo.
- 2.- Exudados Nasales.
- 3.- Secreciones seropurulentas de pacientes con quemaduras.
- 4.- Ratones de 2 ó 3 semanas de vida (destetados), para pruebas de patogenicidad.
- 5.- Suero de bovino fetal y no fetal.
- 6.- Cepa pura de Escherichia coli.
- 7.- Cepas de referencia para el método de isoeléctroenfoque.

A. divionensis (AA1).

A. quina (L 1a).

A. mauritaniensis (SH 197).

A. hatchetti (Bh-2).

A. mauritaniensis (1652).

A. culbertsoni (A 1).

A. lugdunensis (SH 565).

A. castellanii (Neff).

A. lugdunensis (García).

A. castellanii (AC).

A. palestinensis (28o2).

A. rhyodes (R₄ C).

A. palestinensis (REICH).

A. griffini (S-7).

A. polyphaga (P 23).

A. lenticulata (PD-2).

I.- TECNICA DE PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

1.- Medio nutritivo para conservación de Escherichia coli.

La conservación de una cepa de Escherichia coli que sirvió como única fuente de carbono y energía, en el aislamiento de amibas de vida libre, se hizo en medio nutritivo siguiendo el procedimiento a continuación descrito.

El medio nutritivo (Bioxon) fue pesado (23 g/l) y se disolvió con agua destilada. Se hirvió hasta clarificación del medio, ya hervido se esterilizó a 121°C durante 15 minutos en autoclave; y se vació de 15 a 20 ml en cada caja Petri previamente esterilizada; una vez solidificado el agar, se procedió a sembrar la bacteria sobre la superficie del agar, por estría masiva y se incubó a 37°C durante 24 horas para el crecimiento de la bacteria. Comprobado el crecimiento bacteriano, fueron guardadas las cajas en cuarto frío hasta su utilización.

2.- Preparación del inóculo de la bacteria Escherichia coli.

Para asegurar un mejor crecimiento amibiano y más rápida axeni-

zación de las cepas, fue recomendable matar la bacteria por calor lo cual se realizó de la siguiente manera:

En condiciones de esterilidad fueron vertidos 2 ml de agua destilada esterilizada sobre la capa de bacteria sembrada en caja Petri con medio nutritivo, se desprendieron las colonias con una varilla acodada, se trató de formar una mezcla homogénea y se depositó el concentrado bacteriano en un tubo de ensaye esterilizado para ser sometidas a la muerte por calentamiento en baño María a 65 °C durante 40 minutos. Se comprobó que la temperatura del baño fuera la correcta. Transcurrido ese tiempo, se comprobó la muerte de la bacteria, al sembrar 2 gotas del concentrado en medio nutritivo e incubar a 37 °C por 24 horas. El resultado fue, ausencia de crecimiento bacteriano.

3.- Medio no nutritivo con Escherichia coli muerta por calentamiento N.N.E. (Page,1966; Cerva,1986).

Fue utilizado como medio de transporte de las muestras de líquido cefalorraquídeo, así como para el aislamiento de las amibas de vida libre.

Elementos del medio N.N.E. (Cultivo monoxénico).

NaCl	0.120	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.004	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.004	g
NaHPO ₄	0.142	g
KH ₂ PO ₄	0.136	g
Agar Agar	15.0	g
Agua destilada	1 000	ml

Se preparó, mezclando los componentes hasta disolución en agua-destilada, se hirvió hasta clarificación del medio, se esterilizó a 121 ° C durante 15 minutos y se vació de 15 a 20 ml en cada caja de Petri previamente esterilizada. Una vez solidificado el agar, se sembró las placas con Escherichia coli muerta por calentamiento. La siembra se realizó vaciando en cada placa de agar, 0.5 ml (3 a 4 gotas) de la suspensión concentrada de bacteria, se esperó a la evaporación acuosa y fueron invertidas y envueltas en papel o bolsa de polietileno hasta ser utilizadas conservándose en cuarto frío a 4 ° C.

- 4.- Para purificación y preservación de las cepas amibianas aisladas se utilizó el medio SCGYEM o cultivo axénico modificado (Rivera - et al.,1987).

Elementos del cultivo.

Peptona biotriptasa	10.0	g
Glucosa	2.5	g
Na ₂ HPO ₄	3.25	g
KH ₂ PO ₄	0.80	g
Agua destilada	900	ml
Suero fetal de bovino	100	ml
Penicilina G	200	UI/ml
Sulfato de estreptomycin	200	ug/ml

Se mezcló, la peptona biotriptasa, glucosa, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ y -- el agua destilada, se vertió 2.7 ml en tubos con tapón de rosca y fue ron esterilizados en autoclave durante 15 minutos. Al momento de utilizar el medio, se le agregó 0.3 ml de suero fetal de bovino o suero- de bovino descomplementado, junto con el antibiótico.

- 5.- Medio de Bold o medio de transporte para exudados nasales.

El medio basal de Bold (B.B.M.) , es una modificación del medio-Bristol (Bischoff y Bold,1963). Se usó como medio de transporte para la toma de muestra de los exudados nasales de pacientes con síntomas de rinitis crónica.

El medio fue preparado adicionando 10 ml de cada una de las seis siguientes soluciones de elementos mayores y 1 ml de las cuatro soluciones de elementos menores a 936 ml de agua destilada.

Las soluciones de los elementos mayores se prepararon disolviendo la cantidad de sal en 400 ml de agua destilada cada una.

NaNO_3	10.0 g	K_2HPO_4	3.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$		1.0 g	KH_2PO_4	7.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$		3.0 g	NaCl	1.0 g

Las soluciones de los elementos menores se hizo de la siguiente manera:

A.- 50 g de EDTA y 31 g de KOH disueltos en 1 litro de agua destilada.

B.- 4.98 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fueron disueltos en 1 litro de agua ácida.

El agua se preparó con 999 ml de agua destilada y 1 ml de H_2SO_4 concentrado.

C.- 11.42 g de H_3BO_3 fueron disueltos en 1 litro de agua destilada.

D.- Los siguientes elementos fueron disueltos en 1 litro de agua - -
destilada.

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.82 g	MoO_3	0.71 g
$MgCl_2 \cdot 4H_2O$	1.44 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$		1.57 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.49 g			

Se usaron para la toma de muestra tubos de 13x100 con tapón de -
rosca conteniendo 5 ml del medio de Bold, se esterilizaron en autoclave
a $121^\circ C$ durante 15 minutos y fueron conservados en cuarto frío para -
su uso posterior.

II.- Método de tinción de las amibas de vida libre aisladas (Cerva,-
1986).

1.- Soluciones.

1.A.- Alcohol sublimado.

$HgCl_2$	40 g/l	Fueron disueltos en alcohol
$NaCl$	5 g/l	etílico al 50%.

1.B.- Tintura Gomori.

Chromatrope ZR	0.6 g
Verde rápido FCF	0.3 g
Acido fosfo-Wolfrámico	0.6 g
Acido acético	1 ml
Agua destilada	100 ml

1.C.- Hematoxilina-Koolousek.

Hematoxilina	0.15 g
Sulfato de Aluminio-Potasio		5.00 g
Chelaton III	0.15 g
Peryodato de Sodio	20 mg
Agua destilada	100 ml

2.- Desarrollo.

1.1.- Para la fijación de las amibas, se realizó la siembra de -- las mismas en medio SCGYEM modificado en botellas cuadradas de boca ancha de 300 ml aprox., conteniendo 12 ml de medio y un - portaobjetos limpio. Se sembró 0.5 ml de la cepa axénica y se incubó durante 3 días a 30 °C.

- 1.2.- Se comprobó la adhesión de las amibas al portaobjetos, - - auxiliándonos con el microscopio.
- 1.3.- Se introdujo la preparación en alcohol sublimado por una - hora.
- 1.4.- Se escurrió la preparación y se depositó en alcohol al 80%, por 24 horas.
- 1.5.- Transcurrida la deshidratación, se procedió a la tinción.
- 1.6.- Se cubrió con Hematoxilina-Koolousek por un minuto, se enjuagó con agua destilada y se escurrió.
- 1.7.- Se sumergió en LiCO_3 al 1% por 15 segundos, se enjuagó y -- escurrió.
- 1.8.- Se cubrió con tintura Gomori por 10 minutos, se escurrió - el exceso.
- 1.9.- Se sumergió en alcohol etílico absoluto (99 ml) ligeramente acidificado con ácido acético glacial (1 ml) por 15 segundos y se escurrió.

- 1.10.- Se sumergió en alcohol etílico absoluto por 7 segundos y se escurrió.
 - 1.11.- Se sumergió en alcohol etílico absoluto por 7 segundos y se escurrió.
 - 1.12.- Se sumergió en Xilol por 15 segundos.
 - 1.13.- Antes de la evaporación del Xilol, se colocó una gota de bálsamo de Canadá, y se cubrió con cubreobjetos la muestra teñida.
- III.- Cuantificación del concentrado de las amibas aisladas para pruebas de patogenicidad.

Las cepas amibianas se sembraron en medio axénico con tres días de anticipación a la inoculación, y se comprobó el crecimiento óptimo de las amibas al microscopio invertido. Una vez que se corroboró lo anterior, se procedió a desprender de las paredes del tubo las amibas (por enfriamiento en agua con hielo durante un minuto) y fueron sometidas a vibración por 20 segundos. Se centrifugaron a 2 500 rpm 10 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante hasta que-

-dar un ml de medio dentro del tubo y fue sometido una vez más a - -
vibración . Se colocó una gota del concentrado amibiano en la cámara
de Neubauer, y fueron contadas en el cuadrante central del hematocitó
metro al microscopio óptico con el objetivo de 40x. la concentración -
fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{No. de amibas inoculadas} = \frac{\text{No. total de amibas} \times 10\ 000}{0.02}$$

IV.- Preparación del gel de agarosa (EFI).

Soluciones.

1.- Gel de agarosa.

0.3 g de Agarosa para EFI.

3.6 g de Sorbitol.

27 ml de Agua destilada

2.- Sustrato y revelador para Fosfatasa ácida.

Fosfatasa ácida-naphtyl-D (Beta)	100 mg.
Sal negra K	100 mg.
0.05 M Acetato buffer pH 5	100 ml.

Amortiguador (0.05 M Acetato buffer pH 5).

Solución 1.

CH_3COONa	0.82 mg
Agua destilada	100 ml.

Solución 2.

CH_3OOH	0.6 ml
Agua destilada	100 ml

Combinar 35.2 ml de la solución 1 y 14.8 de la solución 2 con -
50 ml de agua destilada.

3.- Sustrato y revelador para propionil esterasa.

Sal azul RR (Rápida)	100 mg
0.1 m Fosfato "buffer" pH 5.7	100 ml
1% (alfa)-naftilpropionato	2 mg
Acetona al 50%	2 ml

Amortiguador (0.1 m Fosfato "buffer" pH 5.7).

Solución 1.

NaH ₂ PO ₄	2.75 g
Agua destilada	100 ml

Solución 2.

Na ₂ HPO ₄	2.83 g
Agua destilada	100 ml

Se mezclan 46 ml de la solución 1 y 4 ml de la solución 2 con --
50 ml de agua destilada.

4.- Sustrato y revelador para Alcohol deshidrogenasa.

Etanol (96%)	3 ml
B-NAD ⁺	50 mg
Nitro azul terazolío (NBT)	30 mg
Fenasil metasulfato (PMS)	2 mg
0.1 M NaCN	5 ml
0.5 M Tris-HCl "buffer" pH 7.1	15 ml
Agua destilada	77 ml

Solución colorante.

0.2% de Azul Page 83 (BDH Chemicals)

6

0.2% de Azul de Coomassie en agua destilada.

Solución Decolorante o Desteñidora.

35% de Etanol.

10% de Ácido acético.

55% de Agua destilada.

Preparación del gel de Agarosa.

En la placa de nivelación, que sirvió como soporte para el gel, se vació 2 ml de agua destilada, se colocó la placa u hoja plástica de "gel bond" para isoeléctroenfoque (EFI), se balancea la hoja de EFI sobre la placa de manera que por cohesión se pegara contra ésta; evitando la formación de burbujas de aire debajo de la hoja, se coloca el molde para gel de agarosa fijándola con los sujetadores dos en el extremo superior y dos más en el inferior.

Se disolvieron los componentes en un matraz Erlenmeyer de 125 ml calentando hasta disolución en baño María. Cuando la agarosa EFI, - - estuvo disuelta, se dejó enfriar la mezcla a 75 °C añadiéndose , a esa temperatura, el anfolito (1.9 ml) de pH 3-10, se mezcló y se vació - rápidamente sobre la hoja plástica previamente tibia auxiliándose, - con la secadora de pelo para evitar el enfriamiento rápido del gel, - vaciando por el extremo superior del molde y posteriormente sobre la superficie, evitando la formación de burbujas de aire, reventándolas antes de la solidificación del gel de agarosa. Se dejó solidificar - de 15 a 20 minutos, después se cortó por los bordes interiores del - molde, se retiró el molde de la hoja de EFI y finalmente se guardó - en la misma charola con que fue cubierto, sobre una capa de papel -- filtro húmedo, en cuarto frío durante 24 horas, para su uso posterior.