

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"DETECCION DE AMIBAS PATOGENAS DEL GENERO
Acanthamoeba POR PCR, EN CUERPOS DE AGUA
RECREATIVOS EN EL ESTADO DE SAN LUIS POTOSI."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :
RICARDO ORTIZ ORTEGA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

MÉXICO, D. F.

2008



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“DETECCIÓN DE AMIBAS PATÓGENAS DEL GÉNERO
Acanthamoeba POR PCR, EN CUERPOS DE AGUA
RECREATIVOS EN EL ESTADO DE
SAN LUIS POTOSÍ.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

R I C A R D O O R T Í Z O R T E G A

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por darme una nueva oportunidad al hacerme una nueva criatura al volver a nacer y conocer que Él siempre está en todo lo que el hombre no entiende pero aún así nos ama.

A MIS ASESORES:

Dra. Patricia Bonilla Lemus

Con infinito agradecimiento por tu incondicional amistad, apoyo en los momentos más difíciles de mi vida académica y sobre todo por tu comprensión como ser humano al estar siempre que te he necesitado.

M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos

A quien sin su apoyo incondicional tanto de espacio y recursos, no habría podido culminar el presente trabajo, gracias por sus consejos sobre todo cuando me dijo "EL QUE NO SABE LO QUE BUSCA, NO VE LO QUE ENCUENTRA". Después de esto, mi vida académica cambió.

Dra. María Antonieta Aladro Lubel.

Por su incondicional disponibilidad y profesionalismo en la revisión y enriquecimiento del presente trabajo.
Mil gracias.

Dr. Pedro Ramírez García

Por tus oportunas, atinadas observaciones y sugerencias, que desde que comenzamos esta aventura en la investigación, siempre he podido contar contigo al compartir alegrías, tristezas y sobre todo experiencias incomparables.

M. en C. María Eva Salinas Cortés

Por tu tiempo y aportaciones académicas para la realización de este mi sueño.

DEDICATORIA

A Telito:

Que siempre fuiste, eres y serás mi razón y motivo de mis metas. Porque en esta nueva etapa he aprendido a valorar cuan importante es contar contigo en toda y cada una de las decisiones de mi vida. Y que no existe ningún grado o logro académico que tenga mayor valor que el saber que siempre estarás a mi lado.

A mis hijos

Dana y Ricardito:

Que a pesar de que aún no lo comprendan y que en un futuro sabrán porque para su Opa son la razón para seguir viviendo. Ustedes son la alegría y el gozo de mi vida, porque me han dado la dicha y el reto más difícil que siempre será el ser un buen ejemplo para los dos.

A todos ustedes:

Que han perdido la fe y que se han sentido que todo se desmorona, que se han sumergido en la soledad o en el olvido personal o que simplemente se han olvidado, que después de todas las pruebas siempre está Dios, que nos ama con un amor infinito y que jamás nos deja desamparados, porque siempre nos tiene en el hueco de su mano.

De manera no tan formal pero con un cariño muy especial, me es indispensable agradecer a las siguientes personas, el orden no tiene ninguna importancia ya que todos tuvieron mucho que ver con este mi sueño. A Hugo (Hugín), por tu fidelidad como amigo sobre todo en los momentos más difíciles en mi prueba, a Gloria Quintero que a pesar de los pocos momentos que hemos tenido sabes que eres y serás mi amiga para siempre, a todos los miembros del aún proyecto CyMA (Ely, Esperanza, Luis Fernando, Lolita, Lupita) que de una u otra manera hemos compartido en las buenas y en las malas, en la abundancia y en la escasez, en la diversión y en la tristeza, de ésta aventura, que la UNAM e Iztacala, nos ha brindado para cumplir y desarrollar nuestras habilidades y aptitudes dentro de la difícil actividad de la Investigación, a mi hermano Germán, por ser mi padre espiritual y que siempre tuvo una palabra de aliento en los momentos más difíciles de mi prueba y siempre me mantuvo fiel a Cristo, a Marco que siempre que lo necesité estuvo presente y dispuesto a darme su ayuda, a los hermanos de RENOVACIÓN, (Fernando e Elizabeth, Jorge y Diana, Roberto, Alfonsina, Carlitos, Socorrito y su esposo, Lidia y Memo). ellos saben porque, Dios los bendice. A Víctor Cerritos por su amistad y preocupación continua, a Luis Alberto e Isabel cómplices en esta nueva aventura de la enseñanza y en especial a la Maestra María Dolores García Carvajal, por su apoyo incondicional en la parte final de este mi sueño. A todos mil gracias.

CONTENIDO	
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Amibas de vida libre	9
2.2 Importancia clínica de <i>Acanthamoeba</i>	10
2.3 Morfología y ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	11
2.4 Cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento de la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)	11
2.5 Cuadro clínico de la queratitis amibiana (QA)	13
2.6 Patogenicidad	13
2.7 Ubicación taxonómica	14
2.8 Epidemiología.	15
2.9 Antecedentes en México	15
2.10 Método tradicional de identificación de <i>Acanthamoeba</i>	17
2.11 Método de Identificación por ADN	17
2.12 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1 Trabajo de campo	24
5.2 Método Tradicional	24
5.3 Método para la técnica de PCR	24
5.4 Aislamiento y cultivo por el método tradicional	24
5.4.1 Cultivo monoxénico	24
5.4.2 Cultivo axénico	25
5.5 Identificación	25
5.5.1 Morfológica	25
5.5.2 Sensibilidad a la temperatura	26
5.5.3 Ensayo de patogenicidad	26
5.6 Identificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
5.6.1 Extracción y Purificación del ADN	27
5.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
5.6.3 Electroforesis de los amplificados en geles de agarosa	29
6. RESULTADOS	31
6.1 Identificación morfológica por el método tradicional	31
6.2 PCR de <i>Acanthamoeba</i>	33
6.2.1 Amplificación del ADN por la técnica de PCR con el iniciador (primer) GP(P ₂)	35
6.2.2 Amplificación del ADN por la técnica de PCR con el iniciador (primer) Ac6	37

7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	46
9. LITERATURA CITADA	47
10. APÉNDICES	54
APÉNDICE I Medios de cultivo y soluciones	54
APÉNDICE II Reactivos para la obtención y amplificación del ADN por PCR	57

CONTENIDO DE FIGURAS

Tabla 1 Distribución geográfica mundial de la Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), EAG y QA.	16
Tabla 2 Características de los sitios de muestreo.	23
Tabla 3 Secuencia de nucleótidos específicos de <i>Acanthamoeba</i> en la PCR.	28
Tabla 4 Origen y número de aislados de <i>Acanthamoeba</i> spp. obtenidos de 74 muestras de agua	30
Tabla 5 Temperatura promedio del agua y del ambiente de los diferentes sitios de muestreo.	31
Tabla 6 Identificación morfológica y pruebas de virulencia.	32
Tabla 7 Resultados de las pruebas de PCR con los iniciadores GP(P ₂) y Ac6.	33
Fig. 1 Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
Fig. 2 Ubicación taxonómica de las amibas de vida libre (AVL) patógenas (Levine et al.,1980)	14
Fig. 3 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P ₂), de las cepas de referencia y de muestras obtenidas del Bañito y del Gogorrón.	34
Fig. 4 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P ₂), del primer muestreo.	35
Fig. 5 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P ₂), del segundo muestreo.	35
Fig. 6 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P ₂), del tercer muestreo.	36
Fig. 7 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P ₂), del cuarto muestreo.	36
Fig. 7a Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P ₂), del cuarto muestreo.	37
Fig. 8 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, de las cepas de referencia y de muestras obtenidas del Bañito y del Gogorrón.	37
Fig. 9 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del primer muestreo.	38
Fig. 10 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del segundo muestreo.	38
Fig. 11 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del tercer y cuarto muestreo.	39
Fig. 12 Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del cuarto muestreo.	39

RESUMEN

Estudios previos han demostrado la presencia en el ambiente de protozoarios como las amibas de vida libre (AVL). Entre éstas, algunas especies del género *Acanthamoeba* pueden causar infecciones severas al hombre como la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) y la queratitis amibiana (QA).

Uno de los problemas asociados con la detección de las AVL, tanto del ambiente como de individuos infectados, es el tiempo requerido para su identificación que en promedio es de una a tres semanas.

El objetivo principal de esta investigación fue comparar el método tradicional para la identificación de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* contra el ensayo de PCR utilizando dos iniciadores en muestras de agua (ambientales) en la Huasteca Potosina,

Durante un ciclo anual se realizaron cuatro muestreos en nueve cuerpos de agua diferentes, como manantiales, cascadas, lagunas, y piscinas alimentadas con aguas termales en la zona de la Huasteca en el estado de San Luís Potosí. Se recolectaron 74 muestras por duplicado (148 en total), 74 muestras se procesaron por los métodos convencionales, cultivo e identificación morfológica del género *Acanthamoeba* y las otras 74 se analizaron por la técnica de PCR, usando los iniciadores GP(P₂) y Ac6, el primero para la detección del género *Acanthamoeba* y el segundo para determinar si las amibas eran patógenas.

En siete de los nueve lugares seleccionados se realizó el aislamiento de 39 amibas del género *Acanthamoeba*. El mayor número de aislados se obtuvo de las albercas "El Bañito", "El Gogorrón" y "Taninul". El estudio de patogenicidad mostró que 34 de los aislados eran patógenos para ratón.

Con el iniciador Ac6, se determinó que 30 de los aislados (76.92%) eran patógenos, con el iniciador GP(P₂), el resultado de 25 muestras (64.10%) coincidió con el método tradicional.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de PCR es una alternativa precisa, rápida y confiable para la identificación de *Acanthamoeba* a nivel de género, usando el iniciador GP(P₂), así como para identificar acantamebas patógenas, con el iniciador Ac6.

Los resultados de este estudio demuestran la presencia de amibas del género *Acanthamoeba* en balnearios populares y cuerpos de agua natural de interés turístico, lo cual representa un riesgo de salud pública.

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL), se encuentran en todo tipo de ambiente, ya que ocupan un lugar importante en la cadena alimentaria de las comunidades naturales del agua y el suelo, y aunque no puede considerarse como un hábitat, también se han encontrado en el aire (Rivera, *et al.*, 1988, 1991).

A este grupo de protozoarios, en un principio se les dio el nombre de "limax" (forma viscosa, babosa), también se han descrito como amibas del suelo, amibas de vida libre y amibas "anfizoicas". Este último término se les dio por la dualidad biológica que presentan, ya que además de ser de vida libre (Page, 1976), pueden manifestarse como parásitos del sistema nervioso central (SNC), del tejido corneal (Kilvington *et al.*, 1990), vaginal y prostático en el humano y algunos animales (Martínez, 1993).

Existe un grupo de especies de AVL que pueden provocar infecciones humanas y animales. Este grupo lo conforman los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* (Visvesvara *et al.*, 1993; Méndez *et al.*, 1996), y probablemente *Hartmannella* (Centeno *et al.*, 1996; Gallegos, 1977).

Las AVL patógenas han adquirido interés debido a que pueden producir patologías severas e incluso ocasionar la muerte (De Jonckheere, 1984).

Las AVL patógenas provocan en el hombre dos trastornos que afectan el SNC: meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) o naegleriosis y la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o acanthamebosis; ambos trastornos son de naturaleza fatal y difieren con respecto al agente etiológico, patogenicidad, sitios de daño, curso y manifestaciones clínicas (John, 1993).

Los reportes a nivel mundial demuestran que las AVL podrían constituirse en un verdadero problema de salud pública, por lo que deberían buscarse en las posibles fuentes de transmisión y en trastornos clínicos para establecer el diagnóstico diferencial, ya que puede ocasionar tener consecuencias secuelas graves ya que los tratamientos son poco efectivos en la mayoría de los casos (Martínez, 1993).

Existe poco conocimiento entre el personal biomédico en relación a los padecimientos que causan estos organismos, por otro lado, los métodos para la identificación y diagnóstico requieren mucho tiempo lo que dificulta conocer la importancia clínica y

epidemiológica de las AVL. De ahí, surge la importancia de desarrollar métodos para la identificación de AVL patógenas basados en técnicas analíticas modernas como lo es el caso de la técnica de PCR.

2. ANTECEDENTES

2.1 Amibas de vida libre

En 1841 Dujardin, describe por primera vez a *Amoeba limax*, una amiba pequeña de vida libre. Posteriormente Page, describe en agua dulce a *Hartmannella limax*, amiba que ya había sido descrita en 1899 por Schardinger con el nombre de *Naegleria gruberi*, quien la encontró en un paciente con disentería. Esta fue la primera vez que se reportó una amiba de vida libre asociada con un cuadro patológico (Rondanelli, 1987).

Culbertson *et al.* (1958; 1959), demostraron la capacidad patógena del género *Acanthamoeba*, al inocularlas en ratones y monos. A partir de estos trabajos se sugirió que el hombre podía ser hospedero de estas amibas y sufrir daño similar al observado en los modelos iniciales.

En el agua se les ha encontrado en agua dulce y potable (Rivera *et al.*,1979), termales naturales (Gallegos, 1977) y en aguas que reciben descargas industriales con temperaturas elevadas que favorecen su proliferación (De Jonckheere,1977; Visvesvara & Stehr-Green,1990). También han sido aislados en diferentes zonas de la región antártica (Rondanelli,1987), aguas y sedimentos marinos (Visvesvara *et al.*,1990; De Jonckheere,1991), aguas de desecho doméstico (Rivera *et al.*,1986a; Pearl *et al.*,1990), en redes de agua potable, en piscinas (Rivera *et al.*, 1983), en lagos, en aguas minerales embotelladas (Visvesvara,1990; Rivera *et al.*,1981), en diferentes tipos de secreciones en el humano tanto de individuos enfermos (Rivera *et al.*,1989), como portadores (Cerva *et al.*,1973). Se les ha encontrado también en tinas de hidromasaje y en unidades dentales (De Jonckheere,1991; Visvesvara,1990; Rivera *et al.*,1993), así como en suelo y aire adheridas a las partículas de polvo (Rivera *et al.*,1987,1988a, 1991, 1992, 1994; Bonilla, 2000).

Las AVL se distribuyen con relativa facilidad en el ambiente, gracias a su capacidad de formar quistes. En los ecosistemas acuáticos, desempeñan un papel importante en las cadenas alimentarias, por ser un eslabón entre los desintegradores y niveles tróficos superiores (Fenchel,1987). En el suelo, son reguladoras de poblaciones bacterianas y ocupan un lugar muy importante en el ciclo de los nutrimentos nitrogenados y del fósforo (Sleigh,1989).

2.2 Importancia clínica de *Acanthamoeba*

En 1960 Kernohan, describió un caso de granuloma cerebral en una joven que murió, presumiblemente infectado por *A. culbertsoni*. Apley en 1970, reportó el caso también de un niño en Gran Bretaña, quien murió también a causa de *Acanthamoeba* (Griffin,1978). Los primeros casos humanos claramente identificados como causados por *Acanthamoeba* spp., fueron reportados en 1972 por Jager y Stamm, y en 1973 por Robert y Rorke (Martínez y Visvesvara,1997).

Los primeros aislamientos de *Acanthamoeba* en tejidos humanos fueron reportados por Visvesvara *et al.* (1983). El primero se aisló de los pulmones de un paciente que murió de EAG, el otro fue recuperado de tejido de un injerto en la mandíbula de un individuo, ambos se identificaron como *A. castellanii*.

También se han aislado de otras partes del cuerpo humano como cavidades nasales, garganta, tejido cerebral, heridas de la piel, en donde las amibas se alimentan de los exudados y de las bacterias adheridas a la superficie (De Jonckheere, 1991; Gullet *et al.*,1979) y en córneas produciendo queratitis (Rondanelli,1987; Kilvington *et al.*,1990,1991).

La invasión del sistema nervioso central (SNC) en este caso, es secundaria a la infección en otro sitio del cuerpo. La puerta de entrada puede ser a través de la piel o mucosas, así como la aspiración de agua o aire contaminados con amibas o quistes de las mismas, una vez en el organismo se establece una lesión primaria desde la cual, por vía sanguínea alcanza el SCN (Pearl *et al.*,1990; Martínez & Visvesvara,1997), y tiene como agente etiológico a *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. palestinensis* y *A. rhyodes*.

El primer registro de QA se presentó en la Gran Bretaña (Nagington,1975), en dos pacientes las amibas provocaron una ulceración crónica progresiva de la córnea, produciendo la pérdida del ojo en uno de ellos. Las amibas fueron identificadas como *A. polyphaga* y *A. castellanii*. En Estados Unidos de Norteamérica los primeros casos reportados se presentaron en Texas (Jones *et al.*,1975). Dos de ellos se diagnosticaron como queratitis y un tercero como uveítis. En los tres reportes, *Acanthamoeba* fue identificada como el agente causal del padecimiento (Martínez & Visvesvara,1977).

2.3 Morfología y ciclo de vida de *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba*, presenta dos estadios: el trofozoíto o forma reproductiva y el quiste o forma vegetativa (Page, 1988; Pussard & Pons, 1977).

El trofozoíto de *Acanthamoeba* mide de 24–56 μm . El núcleo es circular de 7 a 10 μm de diámetro con un nucleolo central, presenta vacuolas contráctiles y una vacuola digestiva de mayor tamaño que estas últimas (John, 1993).

El quiste de *Acanthamoeba* tiene un diámetro de 13–28 μm . En algunas especies, el exoquiste es moderadamente ondulado y el endoquiste presenta un arreglo poligonal, este último es lo que distingue a *Acanthamoeba* de otras AVL y también sirve como referencia para distinguir las variedades de especies del género. Las dos membranas están separadas a lo largo de la periferia y solamente se unen en ciertas partes que corresponden a las puntas de los extremos del polígono, para dar origen a los poros.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos que se llevan a cabo en el proceso de enquistamiento y exquistamiento. Se sabe con certeza que factores ambientales como el pH, la temperatura, la falta de nutrimentos y la desecación del medio pueden iniciar la formación del quiste.

2.4 Cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento de la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)

La EAG, produce una encefalitis granulomatosa subaguda o crónica, difusa, necrotizante, debida a la acción enzimática inducida por hidrolasas lisosomales y a una fosfolipasa capaz de degradar fosfolípidos de la vaina de mielina (Martínez y Visvesvara, 1997). Se estima que estas amibas se diseminan por vía sanguínea, desde la piel o desde los pulmones (Gullet *et al.*, 1979).

Acanthamoeba presenta un curso de invasión lento y preferentemente afecta ganglios basales; las lesiones se caracterizan por ser granulomatosas y al establecerse paulatinamente provocan una encefalomacia, encontrando en ellas tanto trofozoítos como quistes; se presentan parestesias o crisis convulsivas dependiendo del sitio irritado o dañado. Esta enfermedad ocurre en individuos crónicamente inmunodeprimidos o en pacientes inmunocomprometidos incluyendo a pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Pearl *et al.*, 1990; Alvarez *et*

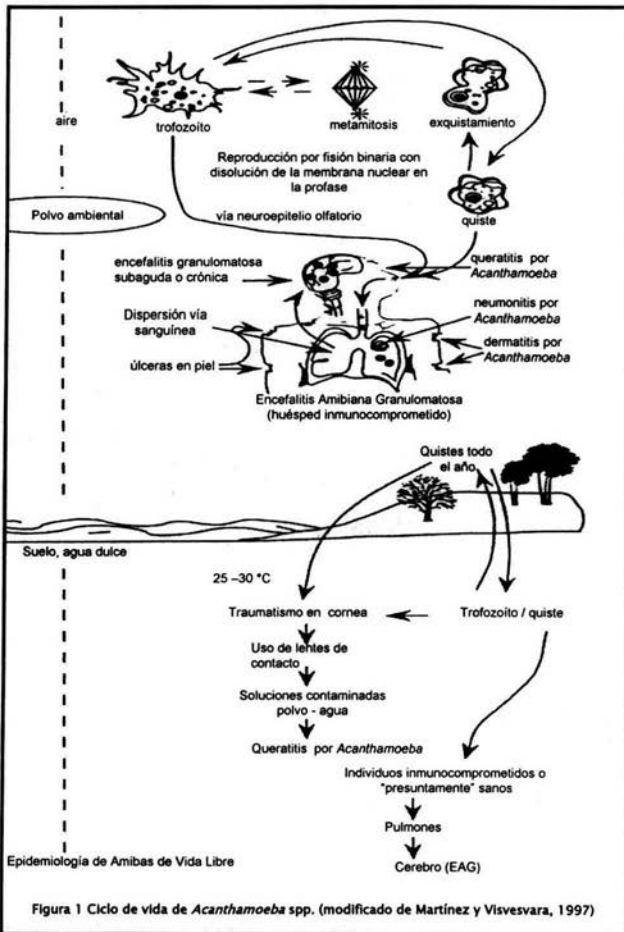
el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Pearl *et al.*,1990; Alvarez *et al.*,1996; Martínez,1993; Ferrante, 1991), diabéticos y alcohólicos (Martínez,1980; Hunt *et al.*,1995), por lo que *Acanthamoeba* se comporta como oportunista (Martínez, 1980).

El cuadro clínico, suele confundirse con tuberculosis cerebral, abscesos cerebrales y afecciones virales (Martínez,1985). Sin embargo, los antecedentes del paciente así como un cuadro respiratorio bajo y la rebeldía al tratamiento del proceso, debe hacer pensar en acantamebosis.

Hasta hoy, el procedimiento más importante para el diagnóstico rápido de EAG ha sido el examen microscópico directo del LCR por medio de preparaciones en fresco y buscando trofozoítos móviles. La desventaja de este método, es que en la clínica

raramente se sospecha de la presencia de AVL, por lo que sencillamente no se buscan y por otro lado, se requiere cierta experiencia para reconocerlas.

A pesar de la información existente acerca de las AVL patógenas, se carece de un tratamiento adecuado para controlar o erradicar la infección de manera efectiva. Se han hecho varios estudios para identificar los agentes terapéuticos más efectivos para controlar las infecciones causadas por *Acanthamoeba* sin que se haya encontrado hasta la fecha, un tratamiento totalmente efectivo (Martínez, 1985).



2.5 Cuadro clínico de la QA.

Otro de los padecimientos producidos por estas amibas, y no menos importante es la queratitis amebiana (QA), la cual aunque no llega a ser fatal, si tiene gran importancia por el aumento en el número de reportes y por los daños que causa a la córnea de las personas afectadas, esta infección es crónica y poco común pero muy devastadora. Principalmente se presenta en individuos jóvenes, sanos e inmunocomprometidos y principalmente entre los usuarios de lentes de contacto.

El cuadro clínico se caracteriza por la presencia de dolor ocular severo, generalmente unilateral, irritación, sensación de cuerpo extraño, fotofobia y evolución crónica a pesar del tratamiento. Los análisis son negativos para hongos, bacterias y virus. Con frecuencia se le llega a confundir con queratitis causada por *Herpes simplex*. (Martínez y Visvesvara, 1997).

El tratamiento de la QA no es sencillo, debido principalmente a la resistencia de estos organismos a los fármacos convencionales usados contra bacterias, hongos, protozoarios y virus. Sin embargo, el ketoconazol, miconazol, isotionato de propamida, han mostrado cierta efectividad en algunos pacientes (Martínez y Visvesvara, 1997). En México, se presentó un caso de QA en donde se uso Itraconazol con éxito (Omaña, 1997).

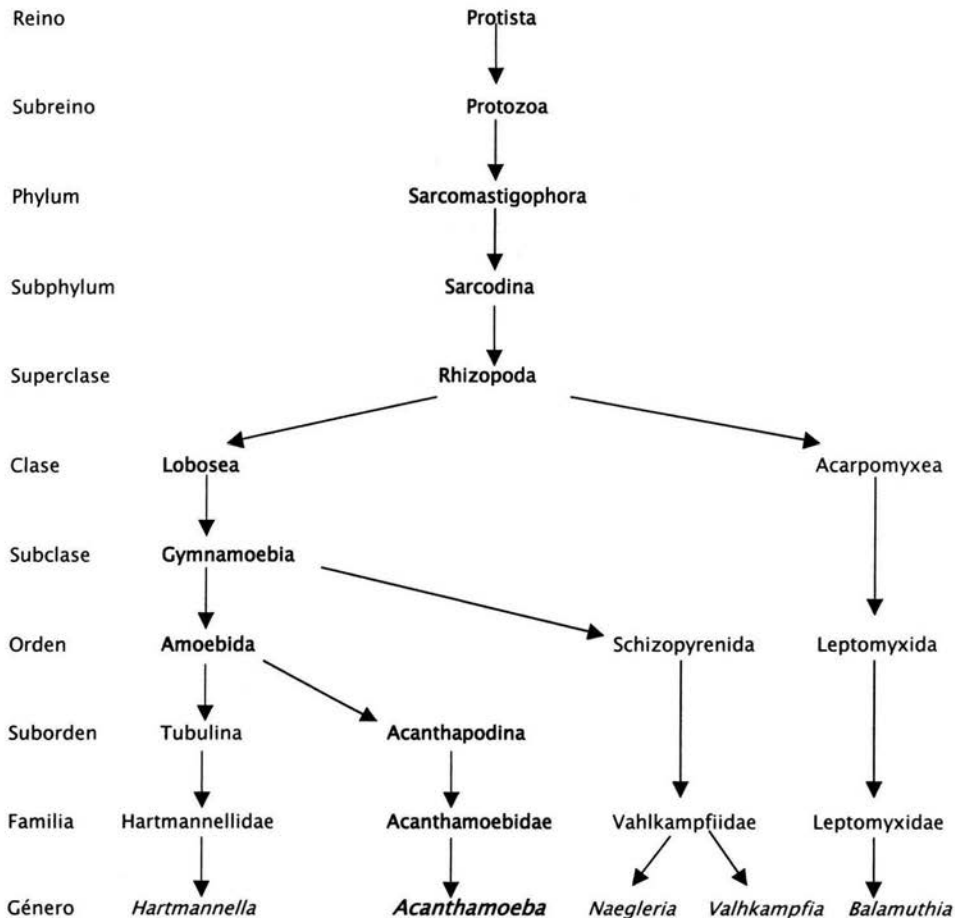
2.6 Patogenicidad

No se conocen con exactitud los mecanismos de patogenicidad de las AVL patógenas, así como tampoco los factores que determinan la infección y por consiguiente la enfermedad que ocasionan, sin embargo, se sabe que en este proceso intervienen funciones como la fagocitosis o a la producción de algunas enzimas como fosfolipasas, lisofosfolipasas, hidrolasas, glicosidasas y elastasas. Estas amibas producen enzimas citopáticas, capaces de degradar proteínas del tejido conectivo (colágena y fibrina), acompañado de un proceso inflamatorio, como por ejemplo *Acanthamoeba castellanii* produce enzimas colagenolíticas, que pueden degradar el tejido corneal (Omaña, 1997).

2.7 Ubicación taxonómica.

La ubicación taxonómica de *Acanthamoeba* de acuerdo a Levine *et al.*, (1980) se muestra en el siguiente esquema.

Figura 2. Ubicación taxonómica de las AVL patógenas



Recientemente la Sociedad de Protozoología (Lee *et al.*, 2000) publicó una guía ilustrada de los protozoos donde ubican al género *Acanthamoeba* como sigue:

“Grupo” Ramicristate amoebae (Gymnamoebae)

Orden Centramoebida

Familia Acanthamoebidae Sawyer & Griffin, 1975

Género *Acanthamoeba* Sawyer & Griffin, 1975

2.8 Epidemiología

La frecuencia real de las infecciones por AVL en humanos no es conocida; sin embargo, hasta la fecha a nivel mundial se reportan aproximadamente 201 casos de MEAP producidos por *Naegleria fowleri*, 171 de EAG ocasionados por *Acanthamoeba* o *Balamuthia* y más de 581 casos de QA causados por *Acanthamoeba* spp. (Martínez *et al.*, 1994; Martínez y Visvesvara, 1997; Lares-Villa, 2001) (Tabla 1).

La EAG se presenta en individuos debilitados o inmunosuprimidos. John (1993) reportó dos casos fatales en individuos con SIDA y Martínez y Visvesvara (1997) reportan que de 100 casos de EAG en Estados Unidos, aproximadamente 50 eran pacientes con SIDA o HIV positivos.

2.9 Antecedentes en México.

En México se reportaron los primeros casos en humanos de MEAP en 1978, causados por *Naegleria fowleri*. Un joven de 16 años con antecedentes de haber nadado en los canales de riego del valle de Mexicali, Baja California (Valenzuela *et al.*, 1984). Desde entonces, 29 casos de MEAP se han diagnosticado en México.

Hasta la fecha se han registrado 12 casos de EAG causados por *Balamuthia* (Lares-Villa, 2001) y solamente uno debido *Acanthamoeba* (Ortiz *et al.*, 2000); cuatro casos de queratitis por *Acanthamoeba*, dos diagnosticados de cultivos de córnea y dos de lentes de contacto con trauma de penetración corneal y exposición a aguas contaminadas (Omaña, 1997; Lares-Villa, 2001).

Por otro lado, se han publicado otros casos clínicos asociados a AVL de la familia Leptomyxidae, a la cual ahora se le conoce como *Balamuthia* (Visvesvara *et al.*, 1993).

Tabla No.1. Distribución geográfica mundial de la MEAP, EAG y QA*

País	MEAP	EAG	QA	Total
Alemania	-	-	2	2
Argentina	-	1	-	1
Australia	19	7	>1	>27
Barbados	-	1	-	1
Bélgica	5	-	>1	6
Brasil	5*	3	>4	>12
Canada	-	5	-	5
Chile	-	1	-	1
China	-	2	-	2
Colombia	-	2	1	3
Corea del sur	1	1	-	2
Cuba	1*	-	-	1
Estados Unidos	81	100	>500	>681
Francia	-	-	3	3
Guam	1	1	-	2
Holanda	-	-	>15	>15
Honduras	-	2	-	2
Hungría	-	-	2	2
India	9*	3	>10	>22
Italia	-	1	3	4
Japón	1	3	3	7
México	29	13	>3	>45
Nueva Guinea	1	-	-	1
Nueva Zelanda	8	-	-	8
Nigeria	4	1	-	5
Panamá	1	-	-	1
Perú	-	14	-	14
Puerto Rico	1	-	-	1
Reino Unido	5	-	>30	<35
Rep. Checa	18	2	-	19
Sudáfrica	1	1	-	2
Suiza	-	-	1	1
Tailandia	5	5	-	10
Uganda	1*	-	-	1
Venezuela	4	3	2	9
Zambia	-	1	-	1
Total	201	172	>581	>954

* Tomado de (Bonilla, 2000; Lares-Villa, 2001)

2.10 Método tradicional de identificación de *Acanthamoeba*

Las muestras de agua o líquido cefaloraquídeo (LCR) se concentran y se siembran en placas de agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (medio NNE) (Rivera *et al.*, 1987; De Jonckheere, 1977). Las placas de medio NNE inoculadas con la muestra de agua se incuban a 37° C durante 48 h., en las placas en donde se observe crecimiento de amibas se marca la zona de mayor abundancia y se transfieren a medios axénicos.

Después de obtener cultivos axénicos, se procede a realizar la identificación morfológica, la prueba de patogenicidad en ratones, análisis de isoenzimas y/o técnicas inmunológicas (Rivera *et al.*, 1987; Bonilla, 2000).

Una de las técnicas que se han usado para la identificación de AVL a nivel de especie, es el análisis de isoenzimas (De Jonckheere, 1987; Rondanelli, 1987; John, 1993). Mediante este método se han logrado detectar patrones enzimáticos distintivos de cada especie, especialmente de *Naegleria* y *Acanthamoeba*, debido al potencial patógeno de algunas de sus especies. Sin embargo, se ha demostrado que no son 100% precisas, ya que organismos de la misma especie pueden mostrar zimogramas diferentes (De Jonckheere, 1983).

El método tradicional para el aislamiento e identificación a nivel de especie de *Acanthamoeba* requiere aproximadamente de 30 a 40 días, además del costo de los medios axénicos y reactivos necesarios para ello.

En los últimos años se han venido desarrollando diferentes métodos de biología molecular, entre éstos, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por sus siglas en inglés, para la identificación de seres vivos. En el caso de las AVL, se ha usado principalmente para identificar amibas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. En lo que concierne al género *Acanthamoeba*, algunos estudios se han enfocado a identificar organismos patógenos a partir de un segmento de su ADN (Vodkin *et al.*, 1992; Lehmann *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 1997).

2.11 Método de Identificación por ADN.

A partir del desarrollo de la PCR en 1985, se abrieron grandes expectativas desde los estudios forenses hasta ecológicos, y de manera especial en el campo de la

investigación médico/clínico. En el caso de los análisis clínicos para la detección de organismos causales de enfermedades, se ha demostrado que la técnica de PCR es una herramienta práctica, rápida y segura, con la condición de que previamente se hayan encontrado la o las secuencias específicas del organismo causante. De la misma manera, la técnica se ha propuesto para identificar organismos del ambiente, por su importancia tanto ecológica como epidemiológica (Kilvington y Beeching, 1995b).

En relación al género *Acanthamoeba*, se han utilizado diferentes técnicas para identificar miembros de este género. Entre éstos se encuentran la técnica de cortes por enzimas de restricción con la creación de los llamados "mapas del genoma" (RFLP por sus siglas en inglés; restriction fragment length polymorphism) del ADN mitocondrial (Costas *et al.*, 1983; Kilvington *et al.*, 1991; Yagita y Endo, 1990); PCR (Vodkin *et al.*, 1992; Lehmann *et al.*, 1998), e hibridación de ADN ribosomal (Gast y Byers, 1995). El uso y desarrollo de estas técnicas se ha enfocado de manera especial a la detección e identificación de organismos con capacidad patógena. (De Jonckheere, 1991; Kilvington y Beeching, 1995a; McLaughlin *et al.*, 1998).

2.12 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los métodos convencionales de análisis molecular requieren de grandes cantidades de muestra de ADN intacto, lo que no es necesario en la técnica de PCR, lo que permite el análisis de muestras de individuos que se encuentran en colecciones de museos, incluyendo a las especies extintas (Arnhelm y Levenson, 1990). Por ejemplo, en la Universidad de California Berkeley, se utilizó la técnica de PCR para amplificar ADN de un animal extinto parecido a la cebra a partir de un trozo de piel (Arnhelm *et al.*, 1990).

La PCR se usó inicialmente en 1986, como una forma de evidenciar la presencia de microorganismos en diferentes ambientes como el suelo, sedimentos y agua. Aunque se usó en la detección de organismos potencialmente patógenos, la sensibilidad y especificidad permitió a los investigadores continuar con estudios básicos de ecología microbiana (Espinosa de los Monteros, 1993).

Una de las primeras aplicaciones de la PCR en biología molecular, fue para conocer la ingeniería de la distribución genética en los microorganismos (GEMs). Los resultados registraron un incremento del doble en sensibilidad comparado con muestras no amplificadas.

La PCR es un proceso enzimático *in vitro* para la amplificación de la secuencia del ADN, a partir de cualquier tipo de ADN patrón (bacteriano, viral, protozoológico, vegetal o animal), extrayendo en ciclos discretos de amplificación, secuencias de ADN, en donde cada uno de estos ciclos puede aumentar al doble la cantidad de ADN patrón en una muestra. La PCR puede aumentar la secuencia de un ADN específico en cientos de millones de veces. La PCR convierte la doble banda del ADN en una banda sencilla, uniendo los iniciadores al ADN patrón y extendiéndolos por la acción de la ADN polimerasa. Los iniciadores que son oligonucleótidos, hibridizan sus homólogos específicos de la secuencia del ADN colocándolos a un costado del segmento de ADN patrón. Para que la ADN polimerasa actúe, necesita de la presencia de trifosfatos de oxinucleótidos libres (dNTPs) (Ronald,1991).

La clave para la eficiencia de la técnica de PCR es el uso de la ADN polimerasa termoestable, normalmente se usa la Taq ADN polimerasa, de esta manera, el ADN puede ser duplicado elevando la temperatura sin desnaturalizar la enzima y con los ciclos repetitivos se produce el incremento exponencial en el ADN, producido a partir del ADN inicial. Los componentes esenciales en la reacción por PCR son: Taq ADN polimerasa, Iniciadores Oligonucleótidos, dNTPs, patrones de ADN y iones de magnesio. Los iniciadores típicos tienen 18 o 28 nucleótidos de largo, conteniendo de 50 o 60 % las bases G+C y la óptima concentración de dNTP suele ser de 20 a 200 micromolar para obtener una adecuada especificidad y fidelidad de la prueba; en cuanto al magnesio, se recomienda de 0.5 a 2.5 milimolar sobre el total de la concentración de dNTP usado (White *et al.*,1989; Arnheim *et al.*,1990).

El procedimiento con el cual se puede amplificar la secuencia de un ADN patrón, necesita al menos una parte por millón del total de la muestra inicial (Arnheim y Levenson,1990).

Para el estudio de poblaciones microbianas, la técnica de PCR ofrece una alternativa mucho más viable que algunos métodos tradicionales, como en la identificación de microorganismos indicadores de la calidad del agua (coliformes) o de organismos causantes de epidemias como *Vibrio cholerae* (Fields *et al.*,1992; Pickup, 1991), ya que se disminuye considerablemente el tiempo de identificación de los organismos causales (Arnheim *et al.*,1990). Además, según Ronald (1991), la técnica se puede aplicar para la detección de varios tipos de microorganismos a la vez, sin problemas de confusión de especies.

De acuerdo a Arnheim y Levenson (1990), la PCR tiene una gran variedad de aplicaciones en diferentes campos de estudio por ejemplo, los siguientes:

1. Detección de comunidades microbiológicas en diferentes ambientes.
2. Monitoreo e identificación de comunidades microbiológicas indicadoras de la calidad del agua.
3. Simplificación de técnicas de biología molecular (clonación, secuenciación y en la modificación específica de la secuencia de ácidos nucleicos).
4. Monitoreo de virus patógenos en muestras de agua.
5. Monitoreo de protozoarios patógenos en el agua.
6. Monitoreo de *Legionella* sp.
7. Monitoreo de la actividad microbiana con metabolismos específicos.
8. Diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas.
9. Análisis retrospectivos en tejidos humanos.
10. Análisis del ADN en medicina forense.
11. Aplicación en diferentes problemas industriales.

La técnica de PCR, causó un gran impacto entre los científicos que se dedican a estudios de Biología molecular, principalmente por su versatilidad, rapidez y disponibilidad para la resolución de diferentes problemas en comparación con los métodos tradicionalmente usados. Ahora la dificultad de aislamiento y la manipulación de secuencias específicas de ADN se han reducido, sobre todo para aquellos que cuentan con un entrenamiento limitado en biología molecular y bioquímica y en los casos en donde los estudios no disponen con grandes cantidades de material biológico.

De esta manera, la aplicación de la técnica de PCR en la identificación de las AVL patógenas, se vuelve de gran utilidad por dos factores que pueden determinar la sobrevivencia de un paciente; el diagnóstico oportuno de la infección y la identificación precisa de la especie amibiana causante. Información de gran relevancia, especialmente con el propósito de aplicar la terapia farmacológica adecuada.

Para llevar a cabo la identificación correcta hasta el nivel de especie de las amibas patógenas, ya sea de muestras del ambiente o de muestras clínicas se requiere personal especializado y con experiencia. Para un técnico de laboratorio y aún para un microbiólogo es muy difícil identificar la especie a la que pertenecen estos organismos, sobre todo si se encuentran o se aíslan en cantidades poco abundantes pues con frecuencia, estas amibas se confunden con facilidad con objetos de diferente naturaleza o células de otro tipo para alguien que no esté bien capacitado.

Hasta el momento se ha trabajado con el aislamiento e identificación de las AVL por los métodos convencionales con cierto éxito; sin embargo, existen varios inconvenientes durante el aislamiento, identificación morfológica, axenización, comprobación de patogenicidad e incluso en la confirmación de especies, además se requieren varios días o semanas para concluir el proceso. En México no se han realizado estudios ambientales en donde se aplique la técnica por PCR para la identificación de *Acanthamoeba*.

Debido a lo anterior, es necesario desarrollar e implementar el uso de técnicas modernas como la de la PCR, tanto para estudios ecológicos y epidemiológicos como para diagnóstico clínico de las enfermedades provocadas por las amibas patógenas de vida libre y evitar así, que el número de muertes por esta enfermedad se incremente.

Con el presente trabajo, se pretende establecer una mejor alternativa al proponer el uso de la PCR para la identificación de amibas del género *Acanthamoeba* (iniciador GP(P₂)), así como acantamoebas patógenas (iniciador Ac6), tanto del ambiente como de casos clínicos, para contar con una herramienta rápida, sensible y confiable.

4. OBJETIVOS

GENERAL:

- Comparar la metodología tradicional para la identificación de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* contra el ensayo de PCR, utilizando dos iniciadores en muestras ambientales (agua).

ESPECÍFICOS:

1.- Aislar amibas patógenas del género *Acanthamoeba* por el método tradicional, en diferentes reservorios de agua en la Huasteca Potosina.

2.- Identificar los aislados utilizando el método de caracterización morfológica y patogenicidad en ratón.

3.- Estandarizar la prueba de PCR con los iniciadores Ac6, GP(P₂), utilizando cepas de referencia.

4.- Caracterizar y comparar con la técnica de PCR las amibas identificadas por el método tradicional.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudios previos realizados por la FES-Iztacala (Proyecto CyMA), en diferentes cuerpos de agua naturales y artificiales en el Edo. de San Luís Potosí, demostraron la presencia de AVL, entre ellas especies del género *Acanthamoeba* (Bonilla, *et al.*, 2000; Gallegos, 1997). Con ese antecedente, se seleccionaron nueve sitios de muestreo cuyas características se resumen en el siguiente cuadro.

Tabla 2. Características de los sitios de muestreo.

Lugar de muestreo	Características	Sitio de toma de muestra	Clave
Media Luna	Laguna natural, manantial y ríos	Laguna principal	ML 1
		Reservorio de flujo continuo	ML 2
		Salida del río hacia el canal de riego	ML 3
Cascaditas	Río de un afluente principal	Parte central del río principal	Ca 1
Tamasopo	Balneario con piscinas artificiales de agua de flujo continuo formando un río	Alberca principal	Tm 1
		Fosa secundaria cercana a la salida del río	Tm 2
Taninul	Balneario con manantial dentro de un hotel, con agua termales, sulfurosas y de flujo continuo formando un río	Parte central de la alberca principal	Tn 1
		Salida hacia el río	Tn 2
Xilitla	Piscinas artificiales alimentadas por un manantial y construidas a lo largo del río	Primera fosa después de una cascada	Xi 1
		Tercera fosa	Xi 2
Tancanhuitz	Fosa natural formada por el flujo continuo del río	Parte cercana a la orilla de la fosa, muy cerca de la carretera	Tan 1
Tambaque	Manantial de aguas de flujo continuo formando un río	Manantial y nacimiento del río	Tam 1
		Lugar de recreación de bañistas	Tam 2
Bañito	Balneario con piscinas artificiales de agua termal de flujo continuo	Fosa principal del manantial	Ba 1
		Piscina principal	Ba 2
		Chapoteadero	Ba 3
Gogorrón	Balneario con piscinas artificiales de aguas termales	Fosa principal	Go 1
		Fosa profunda	Go 2
		Chapoteadero	Go 3

Se realizaron cuatro muestreos trimestrales, uno en cada estación del año, de enero de 1997 a febrero de 1998. Se incluyeron balnearios naturales y artificiales (aquellos que están constituidos por piscinas), tanto termales como no termales.

5.1 Trabajo de campo

Las muestras se tomaron en las zonas más accesibles de los cuerpos de agua , considerando aquellas zonas que las personas prefieren para nadar. Se recolectaron por duplicado en frascos estériles de polipropileno de 1 lt. Las muestras se tomaron en los primeros 10 cm bajo la superficie del agua, considerando cúmulos de algas y demás partículas flotantes, para aumentar la probabilidad de aislamiento (Kyle and Noblet,1987). Se conservaron a temperatura ambiente, para ser procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Luis Potosí, (Unidad Ciudad Valles).

5.2 Método Tradicional.

El primer grupo de muestras, se filtró en membrana Millipore de 8 μm de diámetro, las membranas se colocaron sobre cajas de Petri que contenían medio NNE (De Jonckheere,1977; Page,1988) (Apéndice 1), las cuales, se mantuvieron hasta llegar al laboratorio de la FES-Iztacala antes de 72 hrs., invertidas y en bolsas de plástico, no se congelaron ni se adicionaron preservadores, para evitar dañar las amibas.

5.3 Método para la técnica de PCR.

El segundo grupo de muestras (duplicado), también se filtró con membrana Millipore de 8 μm de diámetro. Se colocó la membrana en un tubo de centrifuga estéril y se adicionaron 5 ml de solución SET (sacarosa EDTA) inmediatamente después de haber filtrado, y se resuspendió por agitación directa, retirándose posteriormente la membrana y congelando la suspensión a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento en que se realizó la extracción del ADN. Todo lo anterior se llevo a cabo bajo condiciones de esterilidad (Innis,1990).

5.4 Aislamiento y cultivo por el método tradicional

5.4.1 Cultivo monoxénico

En el laboratorio de la FES-Iztacala, las membranas se retiraron de la superficie del agar y se observaron al microscopio, localizando y marcando las zonas con crecimiento amibiano. Estas se transfirieron a cajas con NNE por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente ($20-22\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al mismo tiempo, como controles, se

prepararon dos cajas de Petri con NNE, y se incubaron en las mismas condiciones y temperatura durante 24 hrs.

Después del periodo de incubación, los cultivos se observaron diariamente durante 15 días con un microscopio invertido (Zeiss, Mod. D, con objetivos 10X y 40X). De cada una de las placas se aislaron las colonias de amibas y se subcultivaron cada una por separado en medio NNE, incubándose a la misma temperatura a la que crecieron previamente. Para mantener a las amibas aisladas se hicieron subcultivos semanales. El manejo de las placas se realizó con material esteril y en campana de flujo laminar.

5.4.2 Cultivo axénico.

De los cultivos monoaxénicos se seleccionó una zona con crecimiento amibiano en estado de trofozoíto y se transfirieron trozos de aproximadamente 1 cm² a los medios PBSGM (Chang modificado por Rivera, *et al.*,1987) y Bactocasitona (BC) al 2%, con 10% de suero fetal de bovino y se incubaron a 30 °C, manteniendo los tubos inclinados y sin agitación con el fin de que las amibas pudieran adherirse en la mayor superficie posible del tubo (Cerva,1967; Page,1988; Martínez,1985).

5.5 Identificación.

Para la identificación, además de la observación con el microscopio, se consideraron el tamaño de los trofozoítos y quistes (morfometría), la tolerancia a la temperatura y su virulencia.

5.5.1 Morfológica.

La identificación morfológica de las amibas se realizó con un microscopio de contraste de fases (Zeiss Mod. III, objetivos 40X y 100X), realizando preparaciones *in vivo* de cultivos axénicos de los trofozoítos y quistes en diferentes fases de maduración y usando las claves taxonómicas de Pussard y Pons (1977) y Page (1988). Se determinaron el largo, ancho y diámetro del núcleo de 50 trofozoítos e igual número de quistes. Se registraron las diferentes formas tanto del trofozoíto como del quiste, así como las características más relevantes.

5.5.2 Sensibilidad a la temperatura

Esta prueba consiste en determinar la temperatura máxima y óptima de crecimiento de las amibas aisladas. Cada uno de los aislamientos se sembró por cuadruplicado en medio NNE y se incubaron a temperatura ambiente (20–22 °C), 37, 42 y 45 °C y posteriormente se observaron con el microscopio invertido durante una semana verificando el desarrollo amibiano (Page, 1988).

5.5.3 Ensayo de patogenicidad

El ensayo se realizó en grupos de cinco ratones machos de la cepa Cd-1, de tres semanas de edad. Se inocularon trofozoítos obtenidos inmediatamente después de la axenización para evitar que perdieran su virulencia (De Jonckheere, 1983, 1984; Reilly *et al.*, 1983). La inoculación se realizó por vía intracerebral y por instilación nasal. Los trofozoítos de cultivo axénico de aproximadamente 5 días (fase exponencial), se ajustaron a una cuenta de $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ / ml. El volumen inoculado fue de 20 μ l, para la aplicación intracerebral se inoculó a través de la articulación interparietal, a la altura de las orejas (Cerva, 1967a; Ferrante, 1991). Para la inoculación nasal, se aplicó la misma dosis a través de los orificios nasales del ratón. Como testigo se inoculó un grupo de cinco ratones con medio de cultivo sin amibas.

Los ratones se observaron diariamente durante 21 días, registrando los cambios en su comportamiento, así como la fecha. Las cepas se consideran patógenas cuando al término de la prueba, la mortalidad en el grupo de ratones es igual o mayor al 60%. Los animales que sobrevivieron los 21 días, al igual que el grupo control, se sacrificaron introduciéndolos en una cámara con éter y se les extrajo el cerebro, se colocó en medio NNE y se incubaron a 30 °C, con el fin de determinar si hubo desarrollo amibiano en ese órgano.

En los ensayos en donde las amibas presentaron características patógenas, se colocaron porciones de algunos órganos, tanto de los ratones muertos, como de los sacrificados (cerebro, hígado, pulmones y riñones) en placas con medio NNE, que se mantuvieron a 30 °C por 24 – 48 h.

5.6 Identificación por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

5.6.1 Extracción y Purificación del ADN

La extracción del ADN se realizó por el método de fenol cloroformo (Molecular Microbial Ecology Manual, 1995), de acuerdo a la siguiente descripción.

Se cultivaron los trofozoítos (controles positivos) en medio axénico a 30 °C en frascos de cultivo de tejidos de 1 x 180 cm², por aproximadamente cinco días. Se concentró por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 4 ml de buffer de lisis (congelar a -20°C, si no se procesa inmediatamente). Para eliminar las proteínas se trato con 70 µl de proteinasa K y 400 µl de sarkosyl 20% al (2%) y la mezcla se agitó suavemente. Se incubó a 65 °C por 2 horas en baño maria y se enfrió en hielo y transfirió a un tubo separador de suero (TSS Becton Dickinson 6510). A la suspensión obtenida, se le adicionaron 4 ml de una solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente a temperatura ambiente por 3 min.

Se centrifugó a 3,000 rpm. durante 15 min y se recuperó el sobrenadante en otro tubo TSS. Se repitieron los pasos de enfriamiento en hielo y la adición de la solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), hasta que el material desnaturalizado se hizo evidente en la fase orgánica atrapada por debajo de la barra de gel. Se recuperó y se vació el sobrenadante dentro de otro tubo TSS y se le adicionaron 4 ml de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), agitándose suavemente. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min. y el sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga de polipropileno, al cual se le adicionó un volumen igual de isopropanol anhidro, agitándose suavemente y se congeló a -20 °C por una hora o durante toda la noche si no era procesado inmediatamente. El tubo de centrifuga se centrifugó a 3,000 rpm durante 30 minutos y se removió todo el sobrenadante con una micropipeta, se lavó el precipitado dos veces con 2 ml de etanol al 70 % y una con etanol absoluto, centrifugándose ligeramente entre cada lavado y removiendo todo el sobrenadante en cada paso con una micropipeta. Por último, se colocó el precipitado en un desecador al vacío y se disolvió en 100 µl de Buffer Tris-EDTA (TE).

Las muestras de agua de las piscinas y de los cuerpos de agua naturales se procesaron para la purificación de ADN con el mismo procedimiento que para los controles positivos. Esto debido a que los análisis previos han confirmado que el agua de los

sitios muestreados, no contiene desinfectantes y en su mayoría es agua que fluye naturalmente de manantiales. Para eliminar ciertas sales y otros objetos se utilizó un paquete de purificación de ADN (Prep-A-Gene ADN purification Systems).

5.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Los iniciadores (primers) seleccionados son los reportados en European Microbiology Laboratory, Gene Bank y la Base de Datos de Secuencias de Nucleótidos (DDBJ) con clave de acceso número M65180, con esto se obtuvo la secuencia de *Acanthamoeba*, que fueron investigados por homología en las bases de datos mencionadas utilizando el programa FASTA del paquete GCG; utilizando amplímeros de ADN repetitivo (Vodkin *et al.*, 1992).

Extraído el ADN, se procedió a realizar la amplificación del ADN por la técnica de PCR, para el iniciador GP(P₂) de 272-pb, de acuerdo a lo propuesto por Vodkin *et al.* (1992) y Lehmann *et al.*(1998), que identifica amibas del género *Acanthamoeba*, y para el iniciador Ac6 de 195-pb, que identifica especies patógenas de *Acanthamoeba*, propuesto por Howe *et al.*(1997).

La construcción de los iniciadores utilizados en el estudio se muestra en el Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos específicos de los iniciadores de *Acanthamoeba* en la PCR.

Iniciador	Secuencia (5'- 3')	Identifica
GP(P ₂) derecho	¹³⁸³ TCC CCT AGC AGC TTG TG ₁₄₀₀	Género
GP(P ₂) reversa	¹⁶⁵⁵ GTT AAG GTC TCG TTC GTT A ₁₆₇₃	
Ac6/10.derecho	GGC GAA GAA CCT GCA TCA GC	Especies Patógenas
Ac6/210. reversa	CAA CCA ACT CCC GAG CCA	

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR Sytem 2400) y con el paquete de reactivos (GeneAmp PCR Reagent Kit, Parkin Elmer) y la enzima polimerasa (Ampli Taq ADN Polymerase, Parkin Elmer). Se utilizaron como controles negativos, cultivos de cepas de referencia de *A. castellanii* (Neff) y *A. lenticulata* (PD₂) cepas no patógenas; *A. castellanii* (AC), *A. culbertsoni* (Lilly A-1), *A.*

polyphaga (PQ) y *A. lugdunensis* (SH-565), estas últimas como controles positivos, todas patógenas del catálogo de cepas de la American Type Culture Collection (ATCC).

Para la amplificación del iniciador GP(P₂), a cada microtubo se le agregaron 27.5 µl de agua destilada, 5 µl de buffer PCR, 8 µl de la suma de los cuatro desoxiribonucleótidos (dntp), 0.5 µl de Amp Taq, 3 µl de MgCl, 0.5 µl de cada uno de los iniciadores (primers), 5 µl de ADN de la muestra o de la cepa de referencia, dando un volumen total de la reacción fue de 50 µl.

Las temperaturas establecidas al programa del termociclador para cada ciclo fueron de 5min. a 95°C (después del calentamiento), 1.5min. a 94°C (desnaturalización), 1.5min. a 56 °C (alineación), 1.5min. a 72°C (extensión), para 30 ciclos totales y finalmente 1 ciclo de 5min. a 72°C (extensión final)

Del mismo modo, para la amplificación del iniciador Ac6, a cada microtubo se le agregaron 27.5 µl de agua destilada, 5 µl de buffer PCR, 8 µl de la suma de los cuatro desoxiribonucleótidos (dntp), 0.5 µl de Amp Taq, 3 µl de MgCl, 0.5 µl de cada uno de los iniciadores (primers), 5 µl de ADN de la muestra o de la cepa de referencia, el volumen total de la reacción fue de 50 µl.

Las temperaturas establecidas al programa del termociclador para cada ciclo fueron de 1 min. a 95 °C (después del calentamiento), 1 min. a 94 °C (desnaturalización), 1 min. a 64 °C (alineación), 1 min. a 72 °C (extensión), para 30 ciclos totales y finalmente 1 ciclo de 5 min. a 72 °C (extensión final)

5.6.3 Electroforesis de los amplificados en geles de agarosa.

Se prepararon geles de agarosa al 2 % en amortiguador TBE (0.5 X), después de enfriar un poco, se agregó 2µl de bromuro de etidio (10 µg/ml). Se vertió en el molde del gel y el peine formador de pozos adecuado, para tener geles de 0.5 cm de grosor, se dejó polimerizar por 30 min.

Se colocaron 8µl de cada uno de los amplificados más 2 µl del buffer de carga. La electroforesis se realizó en amortiguador TBE y se corrió a 60 voltios (4 voltios/cm²). El gel se observó bajo luz ultravioleta a 305 nm, y se analizó con un sistema para imágenes en gel.

6. RESULTADOS

De los cuatro muestreos realizados, se obtuvieron 148 muestras, de éstas 74 se procesaron por el método tradicional, realizando el aislado de *Acanthamoeba* en 39 de ellas (Tabla 4).

Tabla 4. Origen y número de aislados de *Acanthamoeba* spp. obtenidos de 74 muestras de agua

Sitio de muestreo	1er. Muestreo Enero-97	2° Muestreo Mayo-97	3er. Muestreo Agto-97	4° Muestreo Feb-98	Total de Aislados
Media Luna (ML)	-	-	2	2	4
Cascaditas (Ca)	-	-	-	-	0
Tamasopo (Tm)	-	1	1	2	4
Taninul (Tn)	1	2	2	1	6
Xilitla (Xi)	-	-	-	-	0
Tancanhuitz (Tan)	1	-	-	1	2
Tambaque (Tam)	-	-	-	1	1
Bañito (Ba)	3	3	3	3	12
Gogorrón (Go)	2	2	3	3	10
				total	39

Los 39 aislados se obtuvieron en siete de los nueve lugares de estudio, "El Bañito", "El Gogorrón" y "Taninul" son sitios alimentados con aguas termales y fueron en estos lugares en los que se obtuvieron el mayor número de aislados (Tabla 5).

Tabla 5. Temperatura promedio del agua y del ambiente de los diferentes sitios de muestreo.

Sitio de muestreo	Enero-97	Mayo-97	Agosto-97	Febrero-98
	T. agua / T. amb	T. agua / T. amb	T. agua / T. amb	T. agua / T. amb
Media Luna	29 / 16	30 / 27	30 / 30	29 / 24
Cascaditas	25 / 20	27 / 25	26 / 24	25 / 23
Tamasopo	24 / 20	32 / 25	31 / 25	25 / 22
Taninul	37 / 25	41 / 32	40 / 34	38 / 25
Xilitla	14 / 15	22 / 18	22 / 25	17 / 25
Tancanhuitz	16 / 15	25 / 25	25 / 30	18 / 22
Tambaque	22 / 17	25 / 25	26 / 30	23 / 20
Bañito	31 / 26	32 / 30	34 / 30	31 / 28
Gogorrón	28 / 26	30 / 30	35 / 31	26 / 23

6.1 Identificación morfológica por el método tradicional

De los cuatro aislados de la "Media Luna" el 75% (3/4) resultaron patógenos por ambas vías de inoculación en ratón. De la estación "Tamasopo" el 75% (3/4) de los aislados resultaron positivos a la prueba de patogenicidad. En "Taninul" el 83% (5/6) fueron patógenos. "Tancanhuitz" presentó el 50% (1/2) con resultados positivos. El único aislado obtenido en la estación "Tambaque" resultó patógeno por ambas vías. Por último, en el "El Bañito" el 100% (12/12) de los aislados fueron patógenos y en el "Gogorrón", el 90% (9/10).

La identificación morfológica mostró características de amibas de diferentes géneros los más frecuentes fueron *A. polyphaga* y *A. castellanii*, y otras que solo se identificaron a nivel de género (Tabla 6). El ensayo de virulencia en ratón mostró que 34 de 39 aislados (87%) fueron virulentas para los ratones con una mortalidad mayor del 60 % (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación morfológica y prueba de virulencia de los aislados obtenidos en los diferentes sitios.

Sitio de muestreo	Aislados	Diagnóstico morfológico	Virulencia	
Media Luna	ML 1(4)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	ML 2(3)	<i>A. castellanii</i>	+	
	ML 2(4)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	-	
	ML 3(3)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Cascaditas	0	-----	-----	
Tamasopo	Tm 2(4)a	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Tm 2(3)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Tm 1(2)	<i>A. castellanii</i>	+	
	Tm 2(4)b	<i>Acanthamoeba</i> sp.	-	
Taninul	Tn 1(3)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Tn 2(2)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Tn 1(2)	<i>A. castellanii</i>	+	
	Tn 2(3)	<i>A. castellanii</i>	+	
	Tn 1(1)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Tn 1(4)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	-	
Xilitla	0	-----	-----	
Tancanhuitz	Tan 1(1)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Tan 1(4)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	-	
Tambaque	Tam 1(4)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Bañito	Ba 1(1)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Ba 2(1)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Ba 3(1)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Ba 2(3)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Ba 1(4)	<i>A. polyphaga</i>	+	
	Ba 1(3)	<i>A. castellanii</i>	+	
	Ba 3(3)	<i>A. castellanii</i>	+	
	Ba 3(4)	<i>A. castellanii</i>	+	
	Ba 1(2)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Ba 2(2)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Ba 3(2)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Ba 2(4)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
	Gogorrón	Go 2(4)	<i>A. polyphaga</i>	+
		Go 3(3)	<i>A. polyphaga</i>	-
Go 1(1)		<i>A. castellanii</i>	+	
Go 2(1)		<i>A. castellanii</i>	+	
Go 1(2)		<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Go 2(2)		<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Go 1(3)		<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Go 2(3)		<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Go 1(4)		<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
Go 3(4)		<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	

+: Mortalidad igual o mayor al 60% (Cerva, 1971)

-: Mortalidad menor al 60% (Cerva, 1971)

6.2 PCR de *Acanthamoeba*.

Los resultados de los cuatro muestreos realizados en los nueve sitios elegidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Resultados de las pruebas de PCR con los iniciadores GP(P₂) y Ac6 .

Sitio de muestreo	1er. Muestr			2o. Muestr			3er. Muestr			4o. Muestr		
	GP(P ₂)	Ac6	Patogenicidad **	GP(P ₂)	Ac6	Patogenicidad **	GP(P ₂)	Ac6	Patogenicidad **	GP(P ₂)	Ac6	Patogenicidad **
Media Luna	ML 1(1)	-	-	-	ML 1(2)	-	-	-	ML 1(3)	-	-	-
	ML 2(1)	-	-	-	ML 2(2)	-	-	-	ML 2(3)	-	+	+
	ML 3(1)	-	-	-	ML 3(2)	-	-	-	ML 3(3)	-	-	+
Cascaditas	Ca 1(1)	-	-	-	Ca 1(2)	-	-	-	Ca 1(3)	-	-	-
Tamasopo	Tm 1(1)	-	-	-	Tm 1(2)	-	-	+	Tm 1(3)	-	-	-
	Tm 2(1)	-	-	-	Tm 2(2)	-	-	-	Tm 2(3)	+	-	+
Taninul	Tn 1(1)	-	+	+	Tn 1(2)	+	+	+	Tn 1(3)	+	+	+
	Tn 2(1)	-	-	-	Tn 2(2)	+	+	+	Tn 2(3)	-	-	+
Xilitla	Xi 1(1)	-	-	-	Xi 1(2)	-	-	-	Xi 1(3)	-	-	-
	Xi 2(1)	-	-	-	Xi 2(2)	-	-	-	Xi 2(3)	-	-	-
Tancanhuitz	Tan 1(1)	-	-	+	Tan 1(2)	-	-	-	Tan 1(3)	-	-	-
Tambaque	Tam 1(1)	-	-	-	Tam1(2)	-	-	-	Tam 1(3)	-	-	-
	Tam 2(1)	-	-	-	Tam2(2)	-	-	-	Tam 2(3)	-	-	-
Bañito	Ba 1(1)	+	+	+	Ba 1(2)	+	+	+	Ba 1(3)	+	+	+
	Ba 2(1)	-	+	+	Ba 2(2)	-	+	+	Ba 2(3)	-	+	+
	Ba 3(1)	+	+	+	Ba 3(2)	+	+	+	Ba 3(3)	+	+	+
Gogorrón:	Go 1(1)	+	+	+	Go 1(2)	-	-	+	Go 1(3)	+	+	+
	Go 2(1)	+	+	+	Go 2(2)	+	+	+	Go 2(3)	-	+	+
	Go 3(1)	*	*		Go 3(2)	*	*		Go 3(3)	+	-	-

Nota: - Los resultados resaltados en la tabla muestran los sitios en donde se aislaron amibas del género *Acanthamoeba*.

* - No se tomaron muestras por no contener agua las piscinas.

** - Patogenicidad determinada en rat

Para la caracterización de las amibas mediante el ensayo de PCR, se analizó la sensibilidad y especificidad de la prueba con cepas de referencia.

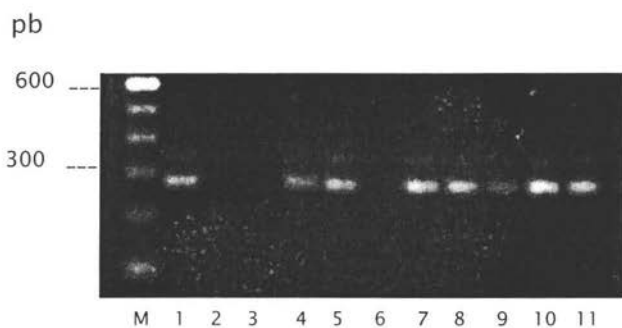


Fig. 3. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P₂), de cepas de referencia y de muestras de agua del Bañito y del Gogorrón. M marcador de peso molecular de 100 pb (M), 1- *A. castellanii* (AC), 2 blanco control, 3 *A. lugdunensis* (SH-565), 4-5 *A. culbertsoni* (Lilly A-1) y *A. polyphaga* (PQ) control positivo, 6 *A. castellanii* (Neff) control negativo, 7-9 muestras del Bañito (Ba 1(1), Ba 2(1), Ba 3(1)) y 10-11 muestras del Gogorrón (Go 1(1) y Go 2(1)).

Con este corrimiento se determinó que las cepas de referencia que podían ser usadas como controles positivos del género *Acanthamoeba* son: *A. castellanii* (AC), *A. culbertsoni* (Lilly A-1) y *A. polyphaga* (PQ), el blanco control se preparó con todos los reactivos menos la cepa de referencia.

6.2.1 Amplificación del ADN por la técnica de PCR con el iniciador GP(P₂).

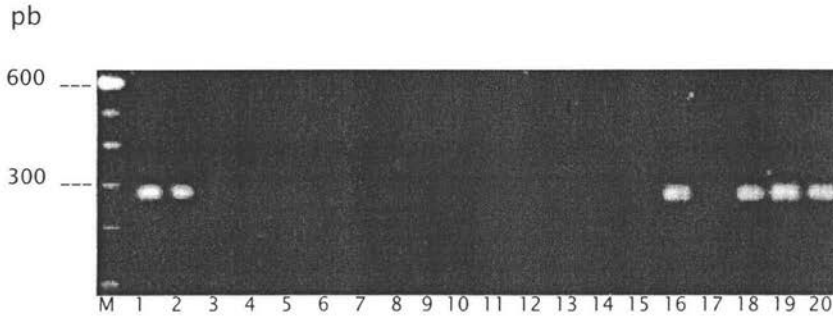


Fig. 4. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P₂), del primer muestreo. (M) marcador de peso molecular de 100 pb, 1-*A. castellanii* (AC); 2 *A. culbertsoni* (Lilly A-1) control positivo; 3-5 Media Luna ML 1(1); ML 2(1); ML 3(1); 6 Cascaditas Ca 1(1); 7-8 Tamasopo Tm 1(1); Tm 2(1); 9-10 Taninul Tn 1(1); Tn 2(1); 11-12 Xilitla Xi 1(1); Xi 2(1); 13 Tancanhuitz Tan 1(1); 14-15 Tambaque Tam 1(1); Tam 2(1); 16-18 El Bañito Ba 1(1); Ba 2(1); Ba 3(1) y 19-20 El Gogorrón Go 1(1); Go 2(1).

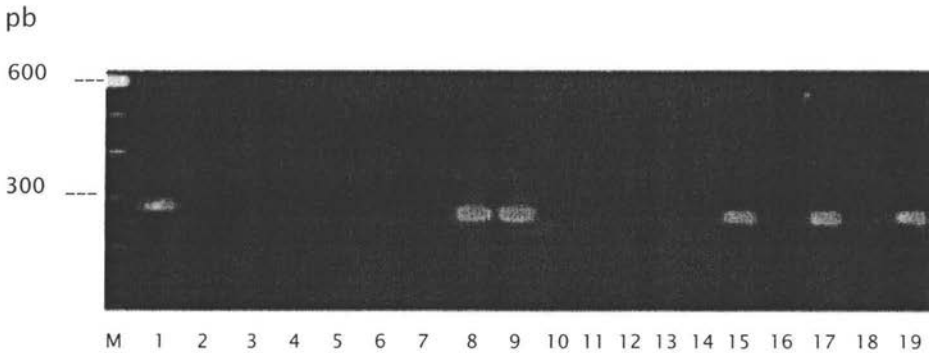


Fig. 5. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P₂), del segundo muestreo. (M) marcador de peso molecular de 100 pb, 1 *A. castellanii* (AC) control positivo; 2-4 Media Luna ML 1(2); ML 2(2); ML 3(2); 5 Cascaditas Ca 1(2); 6-7 Tamasopo Tm 1(2); Tm 2(2); 8-9 Taninul Tn 1(2); Tn 2(2); 10-11 Xilitla Xi 1(2); Xi 2(2); 12 Tancanhuitz Tan 1(2); 13-14 Tambaque Tam 1(2); Tam 2(2); 15-17 El Bañito Ba 1(2); Ba 2(2); Ba 3(2) y 18-19 El Gogorrón Go 1(2); Go 2(2).

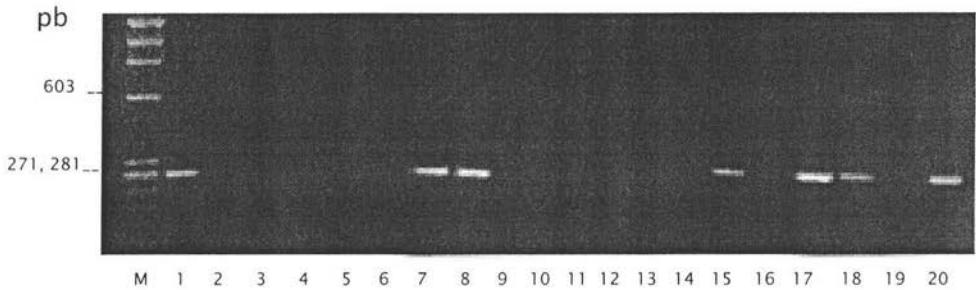


Fig. 6. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P₂), del tercer muestreo. M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III, 1 *A. castellanii* (AC) control positivo; 2-4 Media Luna ML 1(3); ML 2(3); ML 3(3); 5 Cascaditas Ca 1(3); 6-7 Tamasopo Tm 1(3); Tm 2(3); 8-9 Taninul Tn 1(3); Tn 2(3); 10-11 Xilitla Xi 1(3); Xi 2(3); 12 Tancanhuitz Tan 1(3); 13-14 Tambaque Tam 1(3); Tam 2(3); 15-17 El Bañito Ba 1(3); Ba 2(3); Ba 3(3) y 18-20 El Gogorrón Go 1(3); Go 2(3).

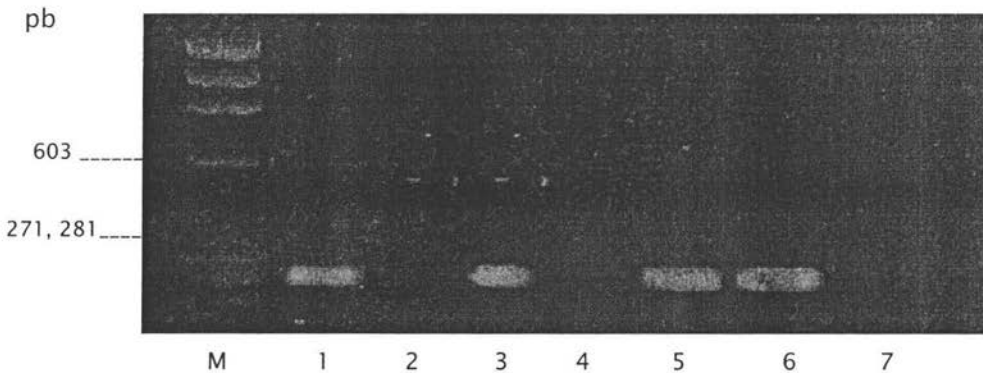


Fig. 7. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P₂), del cuarto muestreo. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III, 1 *A. castellanii* (AC), control positivo; 2 blanco, control negativo; 3-4 Media Luna ML 1(4); ML 2(4); 5-6 Tamasopo Tm 2(4); Tm 2(4); 7 Taninul Tn 1(4).

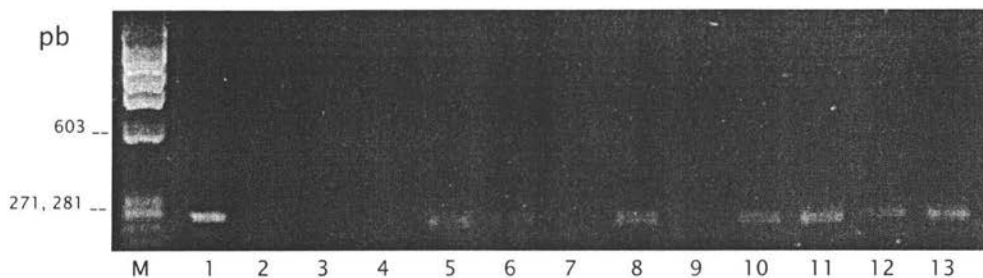


Fig. 7a. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador GP(P₂), del cuarto muestreo. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1 *A. castellanii* (AC), control positivo; 2 blanco, control negativo; 3-4 Xilitla Xi 1(4); Xi 2(4); 5 Tancanhuitz Tan 1(4); 6-7 Tambaque Tam 1(4); Tam 2 (4); 8-10 El Bañito Ba 1(4); Ba 2(4); Ba 3(4) y 11-13 El Gogorrón Go 1(4); Go 2(4); Go 3(4).

En estos corrimientos sólo se muestran resultados de los lugares en donde se aislaron amibas, debido a que ya no se contaba con el suficiente iniciador así como de los otros reactivos para realizar la técnica.

6.2.2 Amplificación del ADN por la técnica de PCR con el iniciador (primer) Ac6.

Del mismo modo que con el primer iniciador, después de la extracción y purificación de las muestras, se realizó un corrimiento con las cepas de referencia y muestras de agua de los lugares en donde en trabajos anteriores se había detectado amibas del género *Acanthamoeba*, como control positivo (Figuras 6-10).

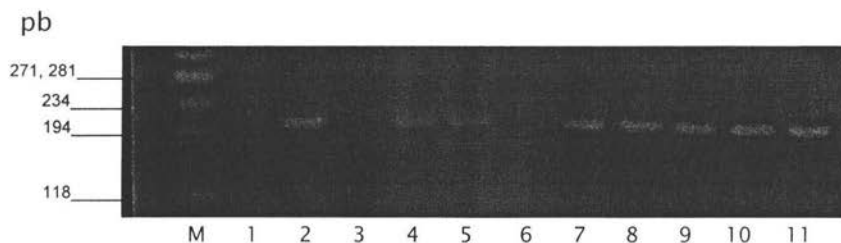


Fig. 8. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, de las cepas de referencia y de muestras de agua obtenidas del Bañito y del Gogorrón. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1 blanco, control negativo; 2 *A. castellanii* (AC) control positivo; 3 *A. lenticulata* (PD₂) control negativo; 4-5 *A. culbertsoni* (Lilly A-1) y *A. polyphaga* (PQ) control positivo, 6 *A. castellanii* (Neff) control negativo, 7-9 muestras del Bañito (Ba 1(1), Ba 2(1), Ba 3(1)) y 10-11 muestras del Gogorrón (Go 1(1) y Go 2(1)).

Con este corrimiento se determinó que las cepas de referencia que podían ser usadas como controles positivos son: *A. castellanii* (AC), *A. culbertsoni* (Lilly A-1) y *A. polyphaga* (PQ).

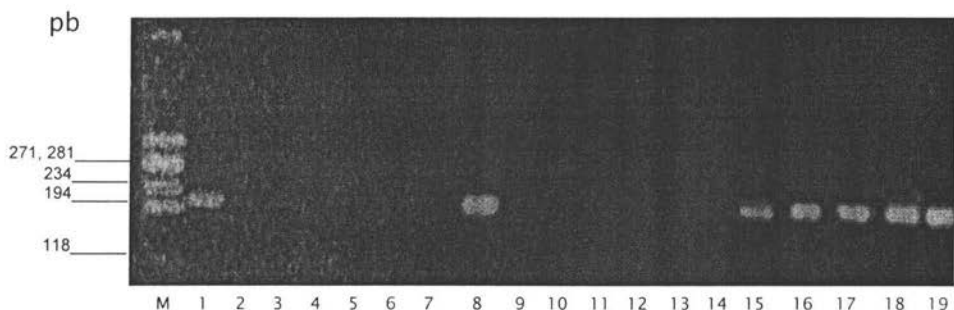


Fig. 9. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del primer muestreo. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1- *A. culbertsoni* (Lilly A-1) control positivo; 2-4 Media Luna ML 1(1); ML 2(1); ML 3(1); 5 Cascaditas Ca 1(1); 6-7 Tamasopo Tm 1(1); Tm 2(1); 8-9 Taninul Tn 1(1); Tn 2(1); 10-11 Xilitla Xi 1(1); Xi 2(1); 12 Tancanhuitz Tan 1(1); 13-14 Tambaque Tam 1(1); Tam 2(1); 15-17 El Bañito Ba 1(1); Ba 2(1); Ba 3(1) y 18-19 El Gogorrón Go 1(1); Go 2(1).

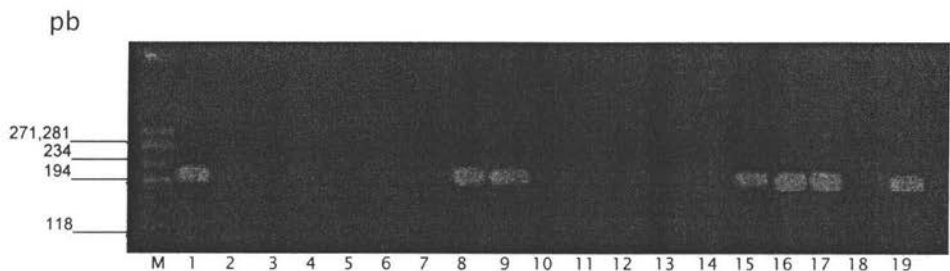


Fig. 10. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del segundo muestreo. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1- *A. culbertsoni* (Lilly A-1), control positivo; 2-4 Media Luna ML 1(2); ML 2(2); ML 3(2); 5 Cascaditas Ca 1(2); 6-7 Tamasopo Tm 1(2); Tm 2(2); 8-9 Taninul Tn 1(2); Tn 2(2); 10-11 Xilitla Xi 1(2); Xi 2(2); 12 Tancanhuitz Tan 1(2); 13-14 Tambaque Tam 1(2); Tam 2(2); 15-17 El Bañito Ba 1(2); Ba 2(2); Ba 3(2) y 18-19 El Gogorrón Go 1(2); Go 2(2).

pb

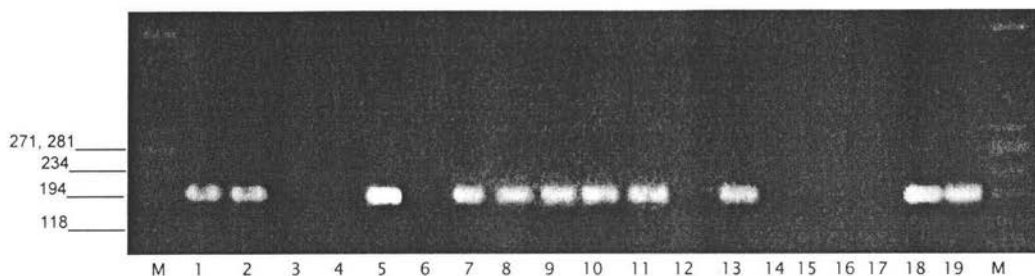


Fig. 11. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del tercer y cuarto muestreo. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1- *A. culbertsoni* (Lilly A-1), control positivo; 2 ML 2(3), 3 ML 3(3), 4 Tamasopo Tm 2(3); 5-6 Taninul Tn 1(3) y Tn 2(3); 7-9 Ba 1(3), Ba 2(3) y Ba 3(3); 10-12 Go 1(3), Go 2(3) y Go3(3); del cuarto muestreo 13-15 Media Luna ML 1(4), ML 2(4) y ML 3(4); 16 Cascaditas Ca 1(4); 17-19 Tamasopo Tm 1(4), Tm 2(4)a y Tm 2(4)b.

pb

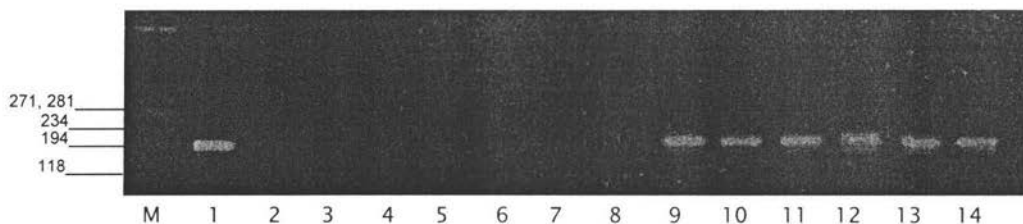


Fig. 12. Amplificación de la fracción de ADN por PCR con el iniciador Ac6, del cuarto muestreo. (M) marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III; 1- *A. culbertsoni* (Lilly A-1), control positivo; 2-3 Taninul Tn 1(4) y Tn 2(4); 4-5 Xilitla; 6 Tancanhuitz Tan 1(4); 7-8 Tambaque Tam 1(4) y Tam 2(4); 9-11 El Bañito Ba 1(4), Ba 2(4) y Ba 3(4); y 12-14 El Gogorrón Go 1(4), Go 2(4) y Go 3(4).

7. DISCUSIÓN

Las AVL son habitantes comunes en el suelo y agua (Sleigh, 1989), en el medio acuático viven en la superficie (adheridas a partículas flotantes), sedimentos y en menor cantidad en la columna de agua (Kyle y Noblet, 1986).

Durante este estudio el aislamiento de amibas del género *Acanthamoeba*, fue muy semejante a lo largo de los cuatro muestreos en la Huasteca Potosina. La temperatura ambiental y del agua no presentó variaciones de importancia (Tabla 5), por lo que se puede decir que no existe un patrón estacional para la presencia de estas amibas en la zona estudiada.

En cuerpos de agua en donde la temperatura prevalece por arriba de los 25 °C (naturales o artificiales), se favorece el desarrollo de las AVL patógenas ya que estas son termotolerantes, la mayoría de los microorganismos que compiten con ellas por el alimento, son eliminadas a esas temperaturas (Griffin, 1973).

De las 74 muestras procesadas por el método tradicional, se obtuvieron 39 aislados del género *Acanthamoeba* (Tabla 6). De éstos, el 30.7% corresponden al Bañito, 25.6% al Gogorrón y el 15.3% al balneario Taninul.

En siete de los nueve sitios analizados, se obtuvieron aislados de *Acanthamoeba*. En los dos restantes (Xilitla y Cascaditas) no se obtuvo ninguno. En Xilitla las muestras, se tomaron de un manantial sin materia orgánica acumulada visible lo que no favorece el desarrollo de las AVL; además de que la temperatura del agua y del ambiente, (Tabla 5) son en general menores que en los otros sitios de muestreo. De igual forma, la estación Cascaditas, es una corriente continua, muy limpia, de velocidad considerable, que no permite estancamientos de agua, impidiendo que se acumule materia orgánica y de esa manera que se formen colonias de microorganismos, aunado a la continua aireación con la consiguiente depuración del agua. Por otro lado, en ambos casos, no existen grandes asentamientos humanos cercanos a la zona de muestreo, que pudieran aportar materia orgánica extra y/o microorganismos.

La laguna la Media Luna, en donde se obtuvieron cuatro aislados, resulta de gran interés ya que es visitada por gran número de personas durante gran parte del año. En el lugar se observan zonas con materia orgánica estancada y basura, por lo que no es sorprendente encontrar organismos como *Acanthamoeba*.

Las fosas de las cascadas de Tamasopo, construidas con fines de esparcimiento, son aguas que presentan un flujo continuo, sin embargo, existen zonas de estancamiento, lo cual favorece la acumulación de materia orgánica, basura y suelo, lo que explica la presencia de amibas.

El mayor número de aislamientos de *Acanthamoeba* se obtuvo de los tres sistemas recreacionales (Gogorrón, Taninul y El Bañito) y aunque el flujo es continuo y son alimentadas directamente de manantiales de aguas termales cuyas temperaturas registradas van de 26–41 °C (Tabla 5), temporalmente el agua está confinada en las albercas por lo que tales estructuras permiten que existan zonas (paredes y esquinas), donde se estanca el agua y se acumula basura. Estas condiciones favorecen la presencia de microhábitats, en donde las AVL encuentran un medio muy favorable ya que están relativamente protegidas, y al mismo tiempo tienen suficiente alimento, oxígeno bacterias, materia orgánica y la temperatura adecuada. Además, como es agua que fluye constantemente, no se le agrega ningún desinfectante (Bonilla, *et al.*, 2000). En el caso del Gogorrón, aunque se presentan temperaturas un poco menores (26–35 °C), en general son temperaturas altas, lo que permite un sitio casi libre de competencia para *Acanthamoeba* (Marciano–Cabral y Fulford, 1986), lo que favorece la presencia de organismos termófilos o al menos resistentes a temperaturas altas.

La afluencia de bañistas es un factor importante en el aporte de amibas al agua, principalmente por el hecho de que las tres piscinas se encuentran rodeadas de pasto y tierra, y el continuo tránsito de los bañistas de estos sitios a las piscinas puede incrementar el número de amibas, así como de bacterias y nutrientes que favorecen la sobrevivencia y desarrollo de las amibas de vida libre.

Cabe hacer mención, que en el caso de Taninul, además de ser alimentada con aguas termales, también son aguas sulfurosas que forman flóculos de materia orgánica, algas y otros organismos que a su vez crean un microhábitat favorable para *Acanthamoeba*.

En el caso de *Acanthamoeba* el diagnóstico morfológico (Tabla 6), por el método tradicional es solamente confiable hasta el nivel de género, por lo que es necesario agregar otras pruebas.

De acuerdo a las pruebas de patogenicidad, el 87.1 % fueron patógenas en ratón, lo cual significa que son potencialmente patógenas para el hombre, esto es muy

importante desde el punto de vista de salud pública, debido a que como ya se mencionó con anterioridad algunas especies oportunistas del género *Acanthamoeba* son probablemente los protozoarios de vida libre más comunes en la naturaleza y son capaces de producir EAG, principalmente en personas inmunosuprimidas tales como individuos con terapia inmunosupresora para trasplante de órganos, con desnutrición, alcohólicos crónicos, mujeres embarazadas, pacientes con SIDA, con lupus eritematoso sistémico o con cualquier otro tipo de supresión provocada por quimioterapia (Martínez y Visvesvara, 1997).

También existen algunos reportes de EAG sin que se presente la inmunosupresión, en donde se afirma que la puerta de entrada es el tracto respiratorio o alguna ulceración en la piel, invadiendo al SNC a través de la vía sanguínea y produciendo finalmente la muerte (Gullet *et al.*, 1979; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997). Así mismo, se ha reportado la presencia de portadores asintomáticos de *Acanthamoeba*, sin que se llegue a manifestar la EAG (Cerva *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1984).

Todos los cuerpos de agua analizados se usan con fines recreativos, lo cual significa que la gente que asiste a estos lugares, son susceptibles de adquirir cualquiera de las infecciones que produce *Acanthamoeba*, especialmente si su sistema inmunológico se encuentra comprometido.

Conociendo el peligro potencial de los balnearios ya mencionados, se podrán tomar medidas para evitar posibles infecciones, aplicando métodos de desinfección apropiados para eliminar éstos organismos y garantizar la seguridad de los visitantes. En el caso de los ambientes naturales la solución no es tan sencilla, principalmente porque al ser cuerpos de agua de flujo continuo y que su hacinamiento no es controlado el uso de métodos de desinfección no se aplicarían con éxito, sin embargo, al conocer el riesgo que en estos lugares existe, es necesario divulgar esta información con el fin de prevenir a los bañistas.

Por lo anterior, surge la importancia de desarrollar métodos de identificación rápidos, precisos y confiables, tanto para su identificación del ambiente (agua en este caso), como de muestras clínicas (líquido cefalorraquídeo y exudados nasofaríngeos entre otros).

De los 39 aislados del género *Acanthamoeba*, 19 (48.7 %) no se pudieron identificar morfológicamente a nivel de especie y sin embargo, 15 de éstas (35.9%), fueron

patógenas en ratón. Lo que demuestra nuevamente, que el método de identificación morfológica no es suficiente para conocer el potencial patógeno de éstas amibas.

Si bien el método tradicional de identificación, resulta efectivo para la identificación de *Acanthamoeba* solo a nivel de género, el desarrollo es demasiado tardado para poder conocer el diagnóstico preciso, ya que se deben realizar pruebas como la identificación morfológica y de patogenicidad, que en promedio, se realizan en 30 días.

Por otro lado, tanto para la identificación morfológica por microscopía, el manejo de las muestras (cultivos), pruebas de patogenicidad y pruebas bioquímicas, se requiere entrenamiento y experiencia, además de conocimiento de las técnicas que se usan para tal fin. Los métodos de biología molecular son más rápidos y adecuados además que en cuanto a la cantidad de muestra se requiere de poca cantidad y se utilizan técnicas de concentración por filtración relativamente sencillas (membranas Millipore) y los resultados se obtienen en pocas horas (4-6 hrs.).

Se han reportado pocos trabajos utilizando iniciadores específicos para la identificación del género *Acanthamoeba*, y todos se han llevado a cabo con amibas obtenidas de muestras clínicas y cultivos de cepas de referencia (Vodkin *et al.*, 1992, Lehmann *et al.*, 1998 y Howe *et al.*, 1997), pero no existen registros a partir de muestras ambientales (agua, en este caso), que es uno de los objetivos del presente trabajo.

En este trabajo, se aplica por primera vez la purificación del ADN total, (la técnica de PCR) en muestras ambientales con el propósito de comparar y evaluar su utilidad en la identificación de amibas patógenas y no patógenas del género *Acanthamoeba*.

De las estaciones de muestreo, donde se obtuvieron aislados del género *Acanthamoeba* por el método tradicional, en el 64.10 % se detectó amplicón para el iniciador GP₂ (Tabla 7), es decir se identificó ADN de amibas del género *Acanthamoeba*. En las muestras donde se obtuvo aislamiento por el método tradicional y no se detectó el amplicón, es probable que haya ocurrido lo siguiente:

- 1.- La manipulación de las muestras durante el desarrollo de la técnica no fue la adecuada.
- 2.- La extracción y purificación del ADN no se haya efectuado adecuadamente y probablemente no se obtuvo la suficiente cantidad.

3.- Como son muestras ambientales de agua, no se garantiza que se haya obtenido el ADN en cantidad es decir el número de amibas presente era muy bajo o no existían en la muestra.

Con respecto al iniciador Ac6, que de acuerdo a Howe *et al.*, (1997), detecta *Acanthamoeba* patógenas, el 76.92 % de las muestras de agua coincidieron con el resultado de la prueba de patogenicidad. En las muestras ML 2(4), Tan 1(4) y Go 3(3), no se presentó el amplicón, lo cual también pudo deberse a algunas de las razones mencionadas para el iniciador GP₂

Como la extracción y purificación del ADN de las muestras de agua se realizó por la técnica de extracción fenólica y los reactivos se prepararon a partir de sus componentes, los resultados obtenidos fueron del todo los esperados. Sin embargo, se observó un alto porcentaje (76.92) de especificidad del iniciador Ac6 para identificar amibas del género *Acanthamoeba* patógenas de muestras de agua y seguramente si se utilizan paquetes (kits) ya conformados, el porcentaje de detección podría ser mayor.

La técnica se desarrolló de acuerdo a Vodkin *et al.*,1992; Lehmann *et al.*,1998, estos autores partieron de cepas de referencia y muestras clínicas de pacientes con queratitis y para llevar a cabo este trabajo, se filtraron las muestras de agua, usando membranas tipo Millipore de 8 micras de diámetro de poro, lo cual dio buenos resultados.

La implementación y uso de la técnica de PCR, es especialmente importante por su aplicación en casos humanos con sospecha de estar infectados por *Acanthamoeba*. Incluso ya con la infraestructura básica, que es lo más costoso, es posible implementar la misma técnica para la detección de otras AVL patógenas como es el caso de *Naegleria* y *Balamuthia*, ya que de esto en ocasiones depende la recuperación del paciente y en otros inclusive la vida, pues como se mencionó en la introducción, la mayoría de los casos de *Acanthamoeba* se han diagnosticado *post-mortem*.

Comparando ambos métodos de identificación, se puede decir que a pesar de que la técnica de PCR en un principio, puede ser costosa a la larga resulta más adecuada para la identificación de amibas del género *Acanthamoeba* del ambiente, ya que una vez implementada, se convierte en una herramienta sumamente útil.

Por otro lado, la obtención de resultados es relativamente rápida, ya que en promedio se pueden conocer en un lapso no mayor de 48 hrs., lo que permitiría proporcionar el

tratamiento específico para los pacientes que hayan sido afectados por estas amibas y de esa manera disminuir la mortalidad.

8. CONCLUSIONES

- De las 74 muestras recolectadas, se obtuvieron 39 aislados identificados morfológicamente como amibas del género *Acanthamoeba* en balnearios y cuerpos de agua natural de interés turístico en el estado de San Luis Potosí.
- De los 39 aislados de *Acanthamoeba* 34 fueron patógenos en ratón.
- Los cuerpos de agua alimentados con aguas termales y confinadas temporalmente en albercas fueron los sitios donde hubo mayor registro de acanthamoebas patógenas y no patógenas, tanto por el método tradicional como por la técnica de PCR. Tales sitios fueron; "El Bañito", "El Gogorrón y "Taninul".
- Por primera vez, se determina la presencia de amibas del género *Acanthamoeba* del ambiente, comparando el uso de dos iniciadores específicos en la técnica de PCR.
- Por primera vez, se realiza un estudio comparativo, entre los métodos tradicionales y la técnica de PCR, para detectar de manera rápida y eficiente la presencia de amibas tanto patógenas como no patógenas del género *Acanthamoeba*.
- De los dos segmentos (iniciadores) GP(P₂) y Ac6, utilizados para amplificar el ADN de *Acanthamoeba*, el iniciador Ac6, presentó un mayor porcentaje de efectividad para la identificación de amibas patógenas del género *Acanthamoeba*.
- El uso de la técnica de PCR, por su sensibilidad y especificidad resulta una herramienta eficiente como método para identificar de manera rápida y precisa la presencia de amibas patógenas del género *Acanthamoeba*, además de reducir el tiempo y trabajo en comparación con los métodos tradicionales.
- Se sugiere que para continuar con los avances en el uso de la técnica para estudios de AVL, se pudiera conocer la concentración mínima de amibas presentes en los diferentes tipos de muestras, para poder ser detectadas por PCR.

9. LITERATURA CITADA

- Álvarez, F., Ramírez, E., Bonilla P., Omaña, M., Portilla, J. & Tórtora, J. Encefalitis amibiana granulomatosa y tumor cerebral. En *Memorias del XII Congreso Nacional de Parasitología*, del 10 al 12 de octubre de 1996, Aguascalientes, Ags.
- Arnhelm, N., & H. Levenson (1990). Polymerase chain reaction. *CyEN Special Report* 10: 38-47.
- Arnhelm, N., White, T., and Rainey, W. (1990). Application of the polymerase chain reaction to organismal and population biology. *Bioscience*, 40: 174-181.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E. & Hernández, D. (2000). Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, Mexico. *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope* pp. 37-44.
- Bonilla, P. (2000). *Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la ciudad de México*. Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias UNAM.
- Carter, R. F. (1970). Description of a *Naegleria sp.* isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and of the experimental changes induced by it. *J. Pathol.* 100: 217-244.
- Centeno, M., Rivera, F. Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E. & Suárez, G. (1996). *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research.* 27(4): 579-586
- Cerva, L. (1967a). Intracerebral, inoculation of experimental animals in pathogenetical studies of *Hartmannella castellanii*. *Folia Parasitol.* (Praha) 14(2): 171-175.
- Cerva, L. (1967b). Intranasal, intrapulmonary and intracardial inoculation of experimental animals with *Hartmannella castellanii*. *Folia Parasitol.* (Praha) 14(3): 207-215.
- Cerva, L., Serbus, C., & Skocil, V. (1973). Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitologica.* 20: 97-103.
- Corliss, J. O. (1994). An interim utilitarian ("user-friendly") hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica.* 33: 1-35.
- Costas, M., Edwards, S.W., Lloyd, D., Griffiths, A.J. & Turner, G. (1983). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Acanthamoeba* as a aid in taxonomy. *FEMS. Microbiol Lett.* 17: 231-234.
- Culbertson, C. G.; Smith, J. W.; Cohen Huk & Minners, J. R. (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba* *Am. J. Pathol.* 35: 185-197.

- De Jonckheere, J. F. (1977). Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (4): 751-757.
- De Jonckheere, J. F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 30 : 701-706.
- De Jonckheere, J. F. (1984). Postgraduate course on biochemical techniques for diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. UNAM. México. 70 pp.
- De Jonckheere, J.F. (1987). Taxonomy, from amphizoic amoebae human. *Pathology* 2: 25-48.
- De Jonckheere. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infections Diseases.* 13(suppl5): 385-7.
- Espinosa de los Monteros, L. E. (1993). Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en el diagnóstico clínico. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 35: 225-230.
- Fenchel, T. (1987). *Ecology of Protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists*. Springer Verlag, Wisconsin. 197 pp.
- Ferrante, A., (1991). Free-living amebas: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology.* 13: 31-47.
- Fields, P. I., Tanja P., Kaye W. & Orjan O. (1992). Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the latin america cholera epidemic. *J. of Clinical Microbiol.* 10: 2118-2121.
- Fowler, M. & Carter, R. F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp : A Preliminary Report. *Brit. Med. J.* 2: 740.
- Gallegos, N. E. (1977). *Amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis Potosí*. Tesis doctoral. Fac.de Ciencias, UNAM. 132pp.
- Gast, R.J. and Byers, T.J. (1995). Genus- and subgenus-specific oligonucleotide probes for *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem Parasitol.* 71: 255-260.
- Griffin, J. L. (1978). Pathogenic Free-living Amoebae. In: Kreier, J. P. , *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, New York. 2: 507-549.
- Gullet, J., Mills, J., Hadley, K., Podemski, B., Pitts, L., & Gelber, R. (1979). Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *Am. J. Med.* 67: 891-896.
- Honigberg, B.M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.O., Gojdics, M., Hall, R.P., Kudo, R.R., Levine, N.D., Loeblich, A.R. Jr., Weiser, J. & Wenrich, D.H. (1994). A revised classification of the phylum Protozoa. *J. Protozool.* 11: 7-20.

- Howe, D. K., Vodkin, M. H., Robert, J. N., Visvesvara, G. S. & McLaughlin, G. L. (1997). Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Parasitol. Res.* **83**: 345-348.
- Hunt, S., Reed, S., Mathews, W., & Torian, B. (1995). Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multidrug therapy. *56* (5): 285-7.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White T. J. (1990). PCR Protocols: *A guide to methods and applications*. Academic Press. pp 1-20.
- John. D. T. (1993). Opportunistically pathogenic free-living amebae. *En: Kreier, J.P. & Baker, J.R. (eds.). Parasitic Protozoa*. Academic Press. San Diego California, U.S.A. **2**(3): 143-246.
- Jones, D. B., Visvesvara, G. S. & Robinson, N. M. (1975). *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* **95**: 221-232.
- Kilvington, S., Larkin, D. F., White, D. C. & Beeching J.R. (1990). Laboratory investigations of *Acanthamoeba* Keratitis. *J. Clin. Microbiol.* **28**(12): 2722 - 2725.
- Kilvington, S., Beeching, J. R. & White, D. G. (1991). Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 310-314.
- Kilvington, S. & Beeching, J. (1995a). Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(6): 2071-2078.
- Kilvington, S. & Beeching, J. (1995b). Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl. Environ Microbiol.* **61**(10): 3764-3767.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1986). Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* **33**: 422-434.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1987). Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaquena. *J. Protozool.* **34**: 10-15.
- Lares-Villa, F. (2001). Free-living amoebae infections in Mexico. *IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*. **1**: 13-18.
- Lee, J. J., Hunter, S. H. & Bovee, E. C. (eds.). (1985). *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Society of Protozoologist, Kansas. U.S.A. pp.1-17; 158-190.
- Lee, J. J., Leedale, G. F. & Bradbury, P. (eds.). (2000). *An Illustrated Guide to the Protozoa*. 2nd Ed. Organisms traditionally referred to as Protozoa or newly discovered groups. Society of Protozoologist. Allen Press Inc. Lawrence, Kansas. U.S.A. Vol I-II: 1-1432.

- Lehmann, O.J., Green, S.M., Morlet, N., Kilvington, S., Keys, M.F., Matheson, M.M., Dart, J. K. G., McGill, J. I. & Watt, P. J.(1998). Polymerase Chain reaction analysis of corneal epithelial and tear Samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *IOVS*. 39(7):1261-1265
- Levine, N.D. Corliss, J. O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honinberg, B.M., Leedale, G.F., Loebich, A.R, Lom., J., Lynn, D., Merinfeld, E.G. Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G.(1980). A newly revised classification of protozoa. *J. Protozool*. 27: 37-58.
- López, C. E., De León, B. B. & De Jonckheere, J. F. (1989). Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo, Michoacán. *Biol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 46(9): 619-622.
- McLaughlin, G. L., Brandt, F. H. & Visvesvara, G. S.(1998). Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected *Naegleria* and *Acanthamoeba* amoebae. *J. Clin. Microbiol*. 26:1655-1658.
- Marciano-Cabral, F. & Fulford, D. E. 1986. Cytopathology of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cell. *Appl. Environ Microbiol*. 51: 1133-1137.
- Martínez, A. J., Sotelo-Avila, C. & García-Tamayo, J. (1977). Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp. pathogenesis and clinico-pathological study. *Acta. Neurophat.* 37: 183-191.
- Martínez, A. J. (1980). Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection?. *Neurology*. 30 : 567 - 574
- Martínez, A. J. (1985). *Free-living amebic: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease*. CRC Press. Boca Raton, Florida. U.S.A. 156 pp.
- Martínez, A. J. (1993). Free living amoebas: infection of the central nervous system. *The Mount Sinai J. Med.* 60(4): 271-8.
- Martínez, A. J., Guerra A. E., García-Tamayo J., Céspedes G., González Alfonso J. E. & Visvesvara G. S. (1994). Granulomatous amebic encephalitis a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol. Berl* 87(4): 430-4.
- Martínez, A. J. & Visvesvara, G. (1997). Free-living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*. 7: 583-598
- Méndez, R. M., Ramírez, E., Bonilla P. & Ortíz, R. (1996). Amibas de vida libre de la familia Leptomyxidae como causa de septicemia. *En Memorias del XII Congreso Nacional de Parasitología*, del 10 al 12 de octubre de 1996, Aguascalientes, Ags.
- Molecular Microbial Ecology Manual (1995). *Extraction of microbial DNA from sewage and manure slurries*. 1.1.3: 1-10.

- Nagington, J. (1975). Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 95 : 207 – 209.
- Omaña, M. (1997). Estudio comparativo de tres cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de queratitis amibiana en México. Tesis de Maestría en Ciencias en el Área de Microbiología. Fes-Cuautitlán-UNAM. México. 165 pp.
- Ortíz, H.A.A., Vázquez, T.O., et al., Morales, Q.D.M., Llamosas, G.B., Flores, R.J.O. & Valencia, R.S. (2000). Encefalitis por amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* spp. *Acta Pediátrica Mexicana*. 21(3): 61–66
- Page, F. C., (1976). An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology. Freshwater Biol. Assoc., Ambleside. Cumbria. England.
- Page, C.F. (1988). *A new key to freshwater and soil gymnamoebae*. Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122 pp.
- Pearl, Ma., Visvesvara, G. S., Martínez, A. J., Theodore, F. H., Daggett, P. M. & Sawyer, T. K. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* Infections. *Infectious Diseases* 12 (3): 490–513.
- Pickup, R. W. (1991). Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *Journal of General Microbiology*. 137:1009–1019.
- Pussard, M. & Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 13 (4): 557–598.
- Reilly, M. F., White, K. L. & Bradley, S. G. 1983. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect Immunity*. 42: 645–652.
- Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. & Paz, M. E. (1979). A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap water in Mexico city. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 98: 465– 469.
- Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal P., González, L. & Lacy, A.M. (1981). Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* 28 (1): 54–56.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. & Medina, F. (1983). A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico city. *Environ. Res.* 32: 205 – 211.
- Rivera, F., Rosas, I., Castillo, m., Chávez, M., Gómez, R. Chio, R.E. & Islas, J. (1984). Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: *Environ.Res.* 33: 428–440.
- Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramirez, E. & Bonilla, P. (1986a). Amoebae in a waste stabilisation pond system in Mexico. *Water Air and Soil Pollut.* 28:185 –198.

- Rivera, F., Rosas, I., Castillo, m., Chávez, M., Gómez, R. Chio, R.E. & Islas, J. (1986b). Pathogenic and free-living Protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environ. Res.* 39: 364–371.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, L., Ramírez, E., Bonilla, P. & Lares, F. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico city and environs. *Environ. Res.* 42:149 – 154.
- Rivera, F., Galván, F., Bonilla, P., Ramírez, E. & Paulín, A. (1988). Pathogenic amoebae isolated from the atmosphere of Mexico city and environs. *En: Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment*, editado por R. Abbou. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, Holanda,. 1175–1179 pp.
- Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchihua, L., & Calderón, A. (1989). Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeningocele, por *Naegleria lovaniensis*. *Enferm. Infec. Pedi.* 2: 91–94.
- Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Rodríguez, S., Labastida, A. Ortiz, R. & Hernández, D. (1991). *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico city. *Infec. Dis.* 13: 388–389.
- Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. & Chávez, M. (1992). Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico city and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* 61: 17–36.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S. Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramírez, P. & Duran, A. (1993). Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.* 62(1): 43–52.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D., & Rivera, V., (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.
- Ronald, M. A. (1991). Environmental applications of the polymerase chain reaction. *ASM, News*, 57(12): 630–632.
- Rondanelli, E. G. (ed.) (1987). *Amphizoic amoebae: Human pathology. Infectious diseases*. Color atlas monographs. Piccin, Pavia, Italy. 279 pp.
- Sleigh, M. (1989). *Protozoa and other protists*. E. Arnold (ed.). London, England. 342 pp.
- Valenzuela, G. A., López-Corella, E. & De Jonckheere, J. F. (1984). Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 558–559.

- Visvesvara, G. S., Mirra, S. S., Brandt, F. H., Moss, D. M., Mathews, H. M. & Martínez, A. J. (1983). Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* 18 : 1405 – 1412.
- Visvesvara, G. S., Martínez, A. J. Shuster, FL. Leitch, G. J., Wallace, S. V., Sawyer, T. K. & Anderson, M. (1990). Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in human and animals., *J. Clin. Microbiol.* 28(12): 2750–2756.
- Visvesvara, G. S., & Stehr–Green, J. K. (1990). Epidemiology of free–living ameba infections. *J. Protozool.* 37 (4): 255–335.
- Visvesvara, G. S., Schuster, F. L. & Martínez J. (1993). *Balamuthia mandrillaris*, N:G., Sp., agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. *J. Euk. Microbiol.* 40: 504–514.
- Vodkin, M.H., Howe, D. K., Visvesvara, G. S. & McLaughlin, G. L. (1992). Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction, *J. Protozool.* 39(3): 378–385.
- White, T., Arnheim, N. & Erlich, H. (1989). “The polymerase chain reaction”. *Trends in Genetics*, 5: 179.
- Willaert, E. & Stevens, R. (1976). Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Pathology Biol.* 24(8): 545–547.
- Yagita, K. & Endo, T. (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J. Protozool.* 37(6) : 570 – 575.

10. APÉNDICES

APÉNDICE I

Medios de cultivo y soluciones

Los aislamientos de amibas del género *Acanthamoeba* se realizaron placas de agar no nutritivo con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes* muerta. Este medio se conoce como NNE (No Nutritivo con *Enterobacter*). Este medio proporciona las sales y la fuente de carbono (*Enterobacter aerogenes*), elementos indispensables para el adecuado desarrollo de estas amibas. Se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1984).

Medio NNE

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

El medio NNE se prepara mezclando los componentes en seco y después agregando el agua destilada que se calienta hasta ebullición. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y cuando se ha enfriado un poco se vacían de 15 a 20 ml de agar en cajas de Petri previamente esterilizadas.

Cuando el agar solidifica, se inocula una suspensión de bacterias *Enterobacter aerogenes* muerta. Las bacterias se obtienen cosechándolas a partir de cultivos puros en solución con agua destilada y muerta en baño de agua a 70 °C por 30 min.

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

MEDIO PBSGM (Chang modificado por Rivera *et al.*,1987)

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

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

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

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

Medio Bactocasitona (BC)

Bactocasitona.....	2.0 g
Agua destilada.....	1 000 ml

Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos, se deja enfriar y se agregan 0.3 ml de suero neonatode bovino con antibióticos. Se guardan en el congelador.

Preparación de suero neonato de bovino para el medio PBSGM y Bactocasitona (BC)

El suero se descongela y se pone en baño María a 56 °C durante 30 minutos para descomplementarlo. Se prepara una mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica y kanamicina de la siguiente manera:

- Penicilina G 1 000 000 U en 2 ml de agua destilada.
- Kanamicina 1 g en solución 3ml.
- Volumen total 5 ml.

Agregar 1.0 ml de la mezcla de antibióticos por cada 100 ml de suero descomplementado. Para obtener una concentración final de 200 μg de cada antibiótico en 3.0 ml de medio.

APÉNDICE II

Reactivos para la obtención y amplificación del ADN por PCR

Amortiguador para lisis celular

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

Proteinasa K

Disolver 10 mg/ml en agua bidestilada. Incubar a 37 °C por una hora, separar en alícuotas y mantener a -20 °C.

Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamilo

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

Los cristales de Fenol deben disolverse con anterioridad, primero con un volumen igual de 1 M Tris-HCl (pH 8.0) y después con otro volumen igual pero en 0.1 M de Tris-HCl también con pH 8.0. Distribuir dentro de frascos de vidrio oscuro, cubrir al fenol con amortiguador TE y mantenerlo alejado de luz. Almacenar a 4 °C si no se usa de inmediato o a -20 °C si es después de 4 semanas.

Cloroformo: Alcohol isoamilo

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

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

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

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

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

Amortiguador TE

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

Proteinasa K

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

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

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

Bromuro de Etidio.

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