



EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

IDENTIFICACION DE *Acanthamoeba* spp EN CD. OBREGON, SONORA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO BIOLÓGICO CLINICO

PRESENTA

Sandoval Quintana Diana

NAVOJOA; SONORA

MARZO DEL 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA.
UNIDAD REGIONAL SUR
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE *Acanthamoeba* spp EN CD. OBREGÓN, SONORA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTA:

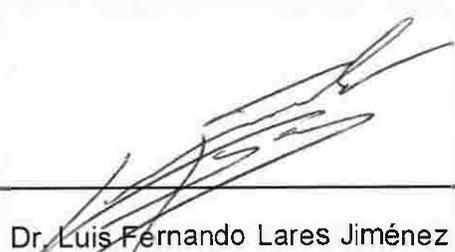
SANDOVAL QUINTANA DIANA

NAVOJOA, SONORA

MARZO 2015

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Diana Sandoval Quintana, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

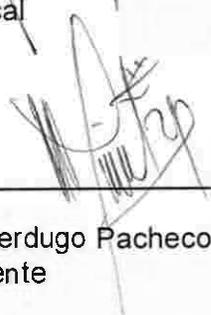


Dr. Luis Fernando Lares Jiménez
Presidente

Dra. Guadalupe González Ochoa
Secretaria



M.C. Ramona Icedo García
Vocal



Q.B.C. Micaela Verdugo Pacheco
Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradece las citas breves del material contenido de este trabajo de Tesis tentativo sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente para la reproducción parcial o total de ésta, con fines académicos se deberá contar con la autorización escrita del jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta Tesis, deberá dar los créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



M.C. Ramona Iédo García

Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Lares Villa y Dr. Luis Fernando Lares Jiménez por ser mis asesores y maestros en el trayecto de este trabajo.

A los maestros de ésta Universidad por su comprensión, paciencia y sabiduría.

A la maestra Claudia Carolina Hernández Peña por su tiempo, su paciencia, sabiduría y amistad a lo largo de este trayecto.

A mi abuela Agustina † por enseñarme esa fuerza y valor para enfrentar los problemas hasta el último aliento.

A mis tíos, tías, primos, primas, por los consejos que no supe escuchar o tomar, discúlpeme.

Y por último, pero no menos importante a mis suegros Ma. Genoveva y José Ildelfonso, por creer en mí, por apoyarme siempre, por quererme tanto. En fin, espero que la vida me dé suficiente para poder retribuir aunque sea un poco de lo mucho que ha significado tenerlos en mi camino.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme vivir en este mundo y sus enseñanzas de amor y misericordia hacia el prójimo que me dio valor para seguir adelante.

A mi tía Dora Evelia y a mi tío Carlos, por ser mis tíos, por enseñarme lo que es ser una verdadera familia, porque pase de ser sobrina a hija, de prima a hermana, gracias.

A mí querido y amado esposo L.A. Ramón Adrián Valle, por enseñarme el valor de lo que soy, a ser mi compañía en mi soledad, pues entre los dos no estamos más solos. Te amo.

Y un especial agradecimiento a mi niña hermosa, mi hija Bianca Lucía por ser la luz de mi vida, mi guía en la oscuridad, eres una luz blanca y pura mi amor que llena de luz, amor y juegos mi vida.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación morfológica	9
Tabla 2 Clasificación actualizada. Cepas de <i>Acanthamoeba</i> spp Aisladas del medio ambiente y humanos	12
Tabla 3 Resultados observados en un examen de LCR en un paciente con EAG	23
Tabla 4 Tipo de muestras recolectadas y su ubicación	36
Tabla 5 Características de crecimiento y análisis de por medición de trofozoitos y quistes de las cepas de sospechosas de <i>Acanthamoeba</i> spp	45
Tabla 6 Especies de <i>Acanthamoeba</i> identificadas por morfología y fisiología	46
Tabla 7 Desplazamiento (mm) de <i>Acanthamoeba</i> a diversas concentraciones de NaCl	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Endosimbiosis parasitaria	3
Figura 2 Mecanismo de infección y ciclo biológico de <i>Acanthamoeba</i>	13
Figura 3 Diferencias morfológicas en función de la capacidad patógena. A: <i>A. castellanii</i> (cepa patógena); B: <i>A. polyphaga</i> (cepa no patógena)	14
Figura 4 Trofozoito de <i>Acanthamoeba</i> . N: núcleo, A: acantópodo	16
Figura 5 Quiste de <i>Acanthamoeba</i>	17
Figura 6 Lesiones cutáneas por <i>Acanthamoeba</i> en caso de encefalitis amibiana granulomatosa	20
Figura 7 Lesiones ocasionadas por <i>Acanthamoeba</i> en caso grave de queratitis Amibiana	22
Figura 8 Queratitis Amibiana. Tejido corneal necrótico y destruido. Quistes esféricos y poligonales de <i>Acanthamoeba</i> spp. (H & E X 1250, aumento original)	24
Figura 9 Procedimiento para muestreo de córnea y cultivo para identificación de <i>Acanthamoeba</i> en pacientes con queratitis	26
Figura 10 Tratamiento utilizado para EAG y QA	28

Figura 11	Productos de limpieza para lentes de contacto blandos	29
Figura 12	De izquierda a derecha: Laguna Nainari (muestra tierra), laguna Nainari (muestra agua), Kino y 200 (muestra tierra) y canal Morelos (muestra agua y tierra)	32
Figura 13	Instituto Tecnológico de Sonora, campus Centro	33
Figura 14	Preparación del medio de cultivo para AVL	35
Figura 15	Campana de flujo laminar	37
Figura 16	Procesamiento general de muestreo	39
Figura 17	Prueba de medición de trofozoítos	41
Figura 18	Medición del crecimiento de <i>Acanthamoeba</i> a diferentes concentraciones de salinidad	42
Figura 19	Velocidad de desplazamiento de <i>Acanthamoeba</i> a diferentes concentraciones de NaCl	48

OBJETIVOS

Identificar especies de *Acanthamoeba* predominantes en la región, por medio de análisis morfológicos de diferentes tipos de muestras de agua y suelo con la finalidad de ampliar la base de datos de las especies endémicas del Sur de Sonora.

Objetivos Específicos

Identificar especies del género *Acanthamoeba* aisladas de agua y suelo de Cd. Obregón para aislar amibas de vida libre.

Aislar amibas de vida libre.

Identificar las amibas del género *Acanthamoeba* por medio del uso de claves taxonómicas y pruebas fisiológicas.

Determinar la patogenicidad de las especies aisladas de *Acanthamoeba* por medio del uso de la prueba de tolerancia a la salinidad.

RESUMEN

Las amibas del género de *Acanthamoeba* forman parte del grupo de las amibas de vida libre que han sido reconocidos como los protozoarios más abundantes de la naturaleza. Varias especies de *Acanthamoeba* son patógenas oportunistas que atacan principalmente a individuos con el sistema inmunológico comprometido o débil, como es el caso del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), o en personas alcohólicas, desnutridas, con diabetes, con tratamiento inmunosupresor, etc. Aquí en el sur de Sonora se han presentado casos de infección por amibas de este género por lo que se han hecho diversas investigaciones en las cuales se han reportado las siguientes especies. *A. castellani*, *A. comandoni*, *A. palestinensis*, *A. lugdunensis* y *A. polyphaga*. Para ampliar el conocimiento de la variedad en el origen de la muestra y la presencia de nuevas especies se obtuvieron 40 puntos de muestreo, se analizaron los diversos orígenes, además se caracterizó tomando en cuenta los parámetros morfológicos pertinentes. El aislamiento se realizó en placas de Petri con agar no nutritivo adicionado con una capa de *E. coli* (NNE). Se obtuvieron 40 muestras iniciales de las cuales 11 fueron *Acanthamoeba* spp. Las 29 restantes pertenecieron a otros géneros. Se identificaron 11 cepas como grupos pertenecientes al I, II y III de acuerdo a las características del quiste. Se identifica a *A. castellani*, *A. rhyssodes*, *A. royreba*, *A. tubiashi* y a *A. gigantea* por primera vez en la región, siguiendo los criterios morfológicos y fisiológicos, quedando pendiente la confirmación por genotificación. La variedad de las muestras permitió aislar una mayor diversidad de especies de *Acanthamoeba*.

CONTENIDO

	Pág.
APROBACION	I
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
OBJETIVO	VIII
RESUMEN	IX
INTRODUCCION	1
Planteamiento del Problema	4
Justificación	5
FUNDAMENTACIÓN	6
Aspectos Clínicos de <i>Acanthamoeba</i>	6
Taxonomía	7
Clasificación.	8
Clasificación Genotípica	10
Mecanismo de Infección	11
Ciclo Biológico	15
Morfología	18

Clínica de Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) y Queratitis Amibiana (QA)	19
Cuadro Clínico	19
Diagnostico	21
Tratamiento	25
Profilaxis	27
Epidemiología de EAG y QA en México	30
MATERIALES Y MÉTODOS	
Sitios de Muestreos	31
Preparación de Medios de Cultivo	31
Muestreo	34
Procesamiento	38
Identificación de Aislamientos	38
Prueba de Temperatura y Medición de Trofozoítos y Quistes	38
Prueba de Tolerancia a Salinidad	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFIA	51

INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoarios del orden Amoebida, los cuales han sido aislados de diversos medios como son agua, polvo y suelo. Se les conoce como organismos anfitriónicos debido a su capacidad de vivir como organismos de vida libre y como parásitos. Por mucho tiempo, las amibas de vida libre fueron consideradas protozoarios sin importancia para la comunidad médica, hasta que algunas especies del género *Acanthamoeba* y la especie *Naegleria fowleri* del género *Naegleria*, mostraron la capacidad de causar enfermedades e incluso la muerte en el hombre y los animales. En comparación con otras enfermedades causadas por protozoos, las infecciones causadas por amibas de vida libre destacan por su amplia distribución y falta de tratamiento efectivo (Konneman, 2001).

El primer caso clínico producido por amibas de vida libre fue descrito en Australia en 1965 y a partir de entonces se han registrado casos en todo el mundo, lo que demuestra su amplia distribución en el mundo y sugiere la posibilidad de que muchos casos hayan pasado inadvertidos por la falta de conocimiento acerca de este grupo de organismos.

Acanthamoeba fue descrita por primera vez en 1930 por Castellani, cuando reportó la presencia de una amiba en cultivos de *Cryptococcus pararoseu*. El género *Acanthamoeba* se estableció en 1931 por Volkonsky. Este género está formado por amibas de vida libre fácilmente reconocibles y que por su frecuencia de aislamiento son probablemente los protozoarios de vida libre más abundantes en la naturaleza (Cortéz-Rocha, 2007).

Algunas especies de *Acanthamoeba* son capaces de ocasionar infecciones en la piel y el sistema nervioso central denominada encefalitis Amibiana

granulomatosa (EAG), la cual suele atacar a pacientes inmunocomprometidos (SIDA, quimioterapias, enfermedades crónicas, debilitantes, diabetes, lupus sistémico, cáncer, desnutrición, alcoholismo, etc.)(Konneman, 2001). Además de EAG, existe otra enfermedad relacionada con *Acanthamoeba* denominada queratitis amibiana (QA), asociada principalmente al uso de lentes de contacto blandos(al mal almacenamiento de éstos y al uso de soluciones de limpieza caseras). Entre las especies identificadas como causantes de queratitis están *A. castellani*, *A. culbertsonii*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. lugdunensis* y *A. palestinensis* (Suarez *et al.*, 2002).

Una de las características de *Acanthamoeba* es que establecen una endosimbiosis con diversas bacterias como son *Legionella pneumophila* y *Micobacterium avium*. Estas bacterias sobreviven dentro de la amiba por medio de la producción de esporas o quistes de resistencia pudiendo incluso multiplicarse dentro de la misma, por ende estas bacterias obtienen una alta virulencia a causa de esta relación simbiótica, es decir, aumentan su factor de virulencia a diferencia de que si produjera la enfermedad por si sola. Además, de que la infectividad de las amibas no se ve alterada por la presencia de estas bacterias. En la Figura 1 se muestra una imagen de *Acanthamoeba* fagocitando una bacteria con el fin de establecer una endosimbiosis parasitaria (Ortega-Rivas, 2002).

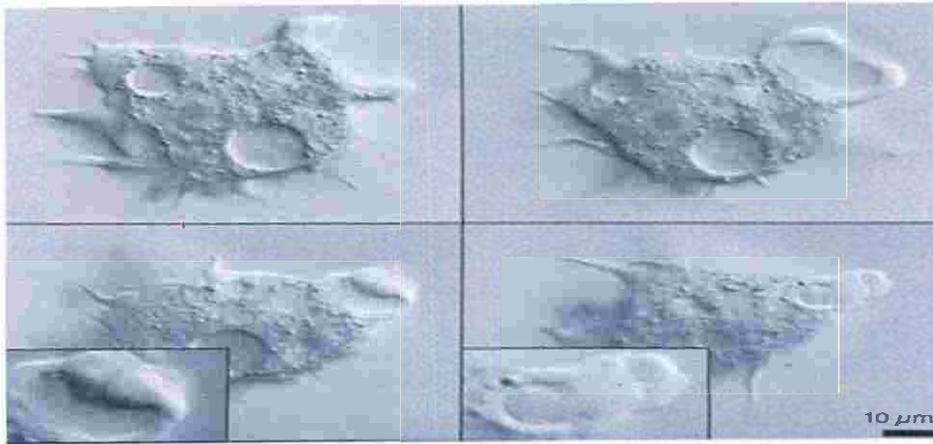


Figura 1. Endosimbiosis parasitaria (*Ortega-Rivas, 2002*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ésta región del país es considerada como una zona semidesértica, por lo que destacan las altas temperaturas y las condiciones óptimas para el desarrollo y nutrición de *Acanthamoeba* (Cortéz-Rocha, 2007).

Se han presentado casos de EAG y QA asociados a *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. comandoniy* *A. palestineñsis* alrededor de todo el mundo, cientos de casos de EAG y cerca de mil casos de QA (Oddó, 2006).

Debido a que aún se desconocen ciertos aspectos de estos parásitos oportunistas en ésta región del país y dada sus condiciones climáticas y ambientales, la diversidad y distribución de *Acanthamoeba* en el sur de Sonora se realiza la siguiente investigación y se pregunta:

¿Qué otras especies del género *Acanthamoeba* se encontrarán en la región del Sur de Sonora además de las ya reportadas?

JUSTIFICACIÓN

La EAG es una enfermedad de evolución lenta e insidiosa que suele ser fatal. Carece de un tratamiento eficaz y aunque hay algunas alternativas, suelen ser altamente agresivos para el paciente (Oddó, 2006).

La QA es un proceso inflamatorio crónico producido por *Acanthamoeba*, asociado al antecedente de un traumatismo corneal y exposición a aguas contaminadas (Oddó, 2006).

Acanthamoeba crece en un rango de -3a 45°C predominan en climas subtropicales en presencia de materia orgánica durante todo el año.

En el estado de Sonora se cuenta con las características ambientales propicias para el desarrollo de amibas de vida libre, además de que ya se han reportado casos de EAG y QA, por lo que es de gran importancia detectar en qué regiones se encuentran este tipo de amibas y alertar a la población que circunde estas regiones para prevenir más casos de enfermedades producidas por las distintas especies patógenas para el hombre (Cortéz-Rocha, 2007).

FUNDAMENTACIÓN

Aspectos Clínicos de *Acanthamoeba*

Las AVL tienen un hábitat muy amplio, pudiendo así encontrarseles en el aire, suelo húmedo, agua dulce o salobre y en vegetales en descomposición. Éstos protozoarios se alimentan selectivamente de bacterias y materia orgánica, pudiendo controlar el número de éstas y la diversidad de especies en su fase de trofozoito, pero al pasar a su estado quístico, pueden ser fácilmente diseminados hacia el medio ambiente por acción del aire, con lo que se explica su gran distribución en los diferentes hábitats que ofrece la naturaleza (Cortéz-Rocha, 2007).

Acanthamoeba es un género de AVL caracterizado por poseer un ciclo biológico que incluye una fase de alimentación conocido como trofozoito y una fase quística que es resistente a los cambios adversos que se pueda presentar el medio ambiente. Muchas especies de *Acanthamoeba* son ubicuas en la naturaleza y fácilmente pueden ser aisladas de albercas, tubos de calefacción, agua dulce, etc. (Hurt *et al.*, 2001).

Se ha establecido a *Acanthamoeba* como un problema de salud emergente debido a su capacidad individual de ocasionar enfermedades en el humano siendo estas EAG y QA. Uno de los problemas más importantes en el estudio de *Acanthamoeba* son los mecanismos por los cuales invade al cuerpo humano que, actualmente, no son bien comprendidos (Alsam *et al.*, 2003).

Taxonomía

El resultado de tomar características morfológicas que recaen enteramente en el quiste y características no morfológicas, como la temperatura de crecimiento se muestra insuficiente para una clasificación de las acantamebas pero con ayuda del análisis isoenzimático se han incorporado nuevas especies que han sido descritas algunos años atrás por lo que se amplió la clasificación taxonómica reconociendo finalmente 17 especies para el género *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

La clasificación taxonómica de las AVL está cambiando debido a los estudios de biología molecular, en especial, a la secuenciación genómica de géneros y especies que se van aislando; sin embargo, se presentan ambigüedades en la clasificación porque estos protozoos constituyen un grupo polifilético (Ayala y Peralta, 2009).

Basándose en la nomenclatura actual, las AVL pertenecen al reino Protozoa y las que generan patologías en los seres humanos pertenecen a dos phyla de éste reino, Percolozoa y Rhizopoda (Ortega-Rivas, 2002).

El phylum Percolozoa agrupa organismos primitivos pudiendo ser estos ameboflagelados, es decir, con uno o más flagelos transitorios. No contienen aparato de Golgi pero sí mitocondrias y peroxisomas. Este Phylum incluye la clase Heterolobosea, el orden Schyzopyrenida, la familia Vahlkampfiidae y los géneros *Naegleria* y *Vahlkampfia* (Ortega-Rivas, 2002).

El phylum Rhizopoda agrupa organismos que poseen pseudópodos que les permiten su locomoción y alimentación además de mitocondrias con crestas

tubulares. La mayoría de este phylum es de vida libre, la cual incluye dos clases:

1. Clase Lobosea

Orden Hartmannellida:

- Familia Hartmannellidae

Género: *Hartmannella*

- Familia Acanthamoebidae

Género: *Acanthamoeba*

Orden Leptomyxa:

- Familia Leptomyxidae

Género: *Balamuthia*

2. Clase: Heterolobosea

Orden: Schyzopyrenida

-Familia: Vahlkampfiidae

Género: *Naegleria* (Ortega-Rivas, 2002)

Clasificación

La identificación a nivel género es relativamente fácil debido a la presencia de los acantópodos. Sin embargo, el uso del criterio morfológico para la identificación de estas amibas a nivel especie ha sido difícil. En la Tabla 1 se muestra la clasificación dada en base a la morfología de *Acanthamoeba* propuesta por Page. *Acanthamoeba* ha sido colocada en tres grupos morfológicos dependiendo del tamaño y forma del quiste:

- a) Grupo I. El quiste es más grande en comparación con los grupos II y III.

Tabla 1. Clasificación morfológica (Page, 1988).

Características del Grupo	Especies
Grupo I Quistes ligeramente estrellados. Tienen un ectoplasma suave y un endoplasma denso. Miden más de 18 μm de diámetro. Tienen más de 5 poros.	<i>A. tubiashi</i> , <i>A. comandoni</i> , <i>A. astronixes</i> , <i>A. gigantea</i>
Grupo II Quistes con endoplasma pronunciados polígonos estrellados u ovoides. Tienen endoplasma denso. Miden menos de 18 μm . Tienen un ectoplasma distintivo.	<i>A. castellani</i> <i>A. mauritanensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. paradivionensis</i> <i>A. griffini</i> <i>A. triangularis</i>
Grupo III Tienen un endoplasma ligeramente redondeado o con ángulos ligeros (ovoides) y un ectoplasma ligero. Miden menos de 19 μm , con menos de 7 poros.	<i>A. palestinesis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. pustulosa</i> <i>A. royreba</i>

- b) Grupo II. Tienen un surco o arrugamiento en el ectoquiste y un endoquiste que puede ser polimórfico, estrellado, poligonal, triangular u oval.
- c) Grupo III. Tienen un ectoquiste delgado y plano, y un endoquiste circular.

Actualmente está en revisión esta clasificación ya que hay métodos moleculares más exactos que utilizan las secuencias nucleótidas de los genes de la subunidad pequeña de ARNr entre otras (Cortéz-Rocha, 2007).

Clasificación Genotípica

La clasificación de *Acanthamoeba* nivel especie empleando únicamente criterios morfológicos resulta una tarea subjetiva que llega a desviarse ligeramente de los resultados obtenidos en estudios taxonómicos utilizando isoenzimas u otros métodos moleculares (Ortega-Rivas, 2002).

La realización de estudios de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) con ADN genómico, de RFLP de ADN mitocondrial (mtRFLP), de homología de secuencia de genes de ARN ribosómico 18S (Rns) y análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa de RFLP (PCR-RFLP) del gen de la subunidad pequeña mitocondrial del ARN ribosomal, han logrado dilucidar las relaciones intragénicas y probar la exactitud del esquema de clasificación morfológica de *Acanthamoeba*, demostrándose así la presencia de una gran divergencia entre especies relacionadas y la detección de coincidencias entre acantamebas de grupos diferentes (Ortega-Rivas, 2002).

En la Tabla 2 se presenta una comparación entre la clasificación tradicional (por grupo) y la actual (por tipos), basada en el genotipo y el grupo al que pertenecen según la forma del quiste.

Mecanismo de Infección.

En el caso de las infecciones como EAG, se producen al entrar en contacto ya sea por medio del contacto directo con la cavidad nasofaríngea o por contacto directo en lesiones epiteliales las cuales conducirán al trofozoíto por el torrente sanguíneo hacia el sistema nervioso central u otros órganos (Figura 2). Se presenta en pacientes con una inmunodepresión general. Para llevar a cabo sus efectos citopáticos sobre el hospedador, la amiba estará dependiendo de su capacidad de adhesión, la cual, está dada por la cantidad de acantópodos que está presente (Figura 3). La unión a las superficies epiteliales se produce a través de las proteínas de unión a la manosa que se presenta en la membrana superficial de la amiba, mientras que las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie del epitelio facilitarán esta unión liberando así factores proteolíticos como: colagenolíticos, serinproteasicos y las más relevantes que son las fosfolipasas y neuraminidasas, en donde, estas últimas son las que se producen en mayor cantidad en las cepas con mayor virulencia (Ortega-Rivas, 2002).

Tabla 2. Clasificación actualizada. Cepas de *Acanthamoeba* spp. Aisladas del medio ambiente y humanos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Especies	Cepa	Tipo	Grupo	Fuente de aislamiento
<i>A. astronyxis</i>	30137	T7	I	agua
<i>A. castellanii</i>	30011	T4	II	levaduras
<i>A. commandoni</i>	30135	T9	I	humus de jardín
<i>A. culbertsoni</i>	30171	T10	III	células de riñón de mono
<i>A. divionensis</i>	50238		II	suelo
<i>A. echinulata</i>	50239		I	composta
<i>A. griffini</i>	30731	T3	II	agua de mar
<i>A. hatchetti</i>	30730	T11	II	sedimentos de puertos
<i>A. healyi</i>	CDC:1283v.13	T12	III	cerebro
<i>A. jacobsi</i>	30732		III	sedimento marino
<i>A. lenticulata</i>	30841	T5	III	albercas
<i>A. lugdunensis</i>	50240	T4	II	tinas
<i>A. mauritaniensis</i>	50253	T4	II	lodo
<i>A. palestinensis</i>	30870	T2	III	suelo
<i>A. pearcei</i>	50435	T3	I	sedimento de cloaca
<i>A. polyphaga</i>	CCPA1511/3 ^a	T4	II	charca, vivero
<i>A. pustulosa</i>	50252(GE3a)	T2	III	alberca
<i>A. quina</i>	50241		II	alberca
<i>A. rhyssodes</i>	30973	T4	II	suelo
<i>A. royreba</i>	30884	T4	III	coriocarcinoma humano
<i>A. stevensoni</i>	50438	T11	II	estero
<i>A. triangularis</i>	50254	T4	II	heces humanas
<i>A. tubiashi</i>	30867	T8	I	agua de río

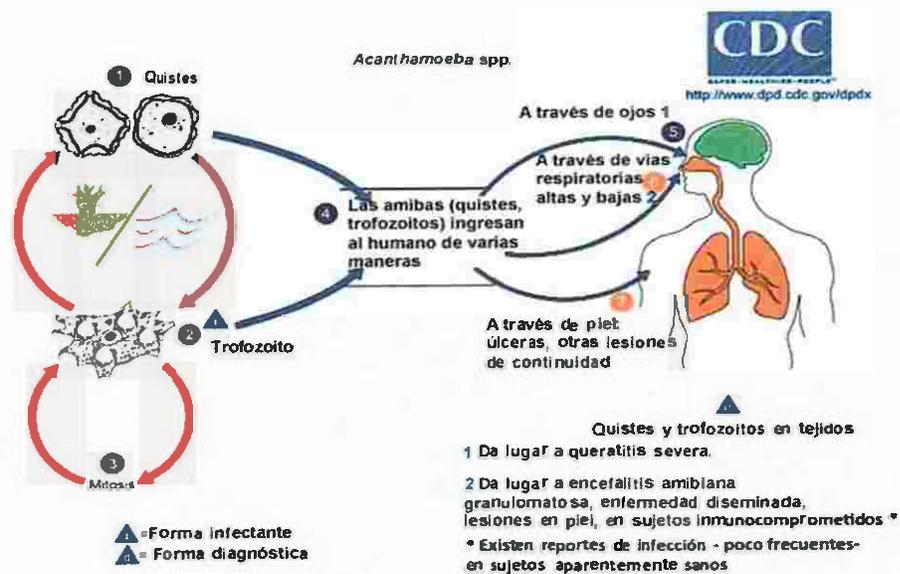


Figura 2. Mecanismo de infección y ciclo biológico de *Acanthamoeba* (DPDx/CDC).

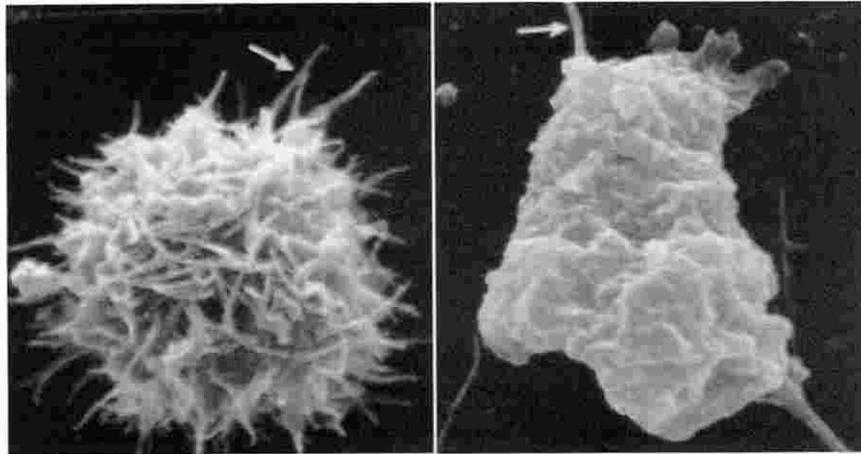


Figura 3. Diferencias morfológicas en función de la capacidad patógena. A: *A. castellanii*(cepa patógena); B: *A. polyphaga*(cepa no patógena) (Ortega-Rivas, 2002).

En el caso de QA el proceso infeccioso se inicia cuando los trofozoitos entran en contacto con el epitelio de la córnea. Esto puede ocurrir por el uso de lentes de contacto contaminados, que actúan como vectores al transportar las amibas hasta el ojo, o bien por contacto directo de una lesión con agua, aire o elementos contaminados con trofozoitos y quistes. Después de la unión del trofozoito se inicia un proceso de descamación celular, producto de la citólisis, la fagocitosis y la apoptosis inducidas sobre las células epiteliales. Si el proceso avanza, hay invasión del estroma, con inflamación intensa. Los trofozoitos secretan serina y cisteína proteasas, elastasa, metaloproteinasas, colagenasas y un activador del plasminógeno, compuestos encargados de destruir la matriz extracelular y permitir su acceso al estroma. Los trofozoitos afectan al nervio óptico y provocan una neuritis radial, responsable del dolor extremo que caracteriza a esta patología (Gertiser, *et. al*, 2010).

Ciclo Biológico

El ciclo biológico de *Acanthamoeba* se dice que es monoxénico simple, ya que no posee hospederos intermediarios. Consta de una fase de trofozoito que es la fase infectiva (Figura 4) y una fase quística (Figura 5), que es la identificable, durante el diagnóstico de la enfermedad (Lawrence *et al.*, 2005).

El trofozoito presenta forma variable, se desplaza por medio de pseudópodos o extensiones citoplasmáticas llamadas acantópodos, los cuales se encargan de la captación de alimentos por medio de fagocitosis. Se alimentan de bacterias, levadura y algas. Se reproducen por fisión binaria asexual. Esta fase es la que se encuentra inmersa en el medio ambiente cuando las condiciones del medio ambiente son favorables (Oddó, 2006).

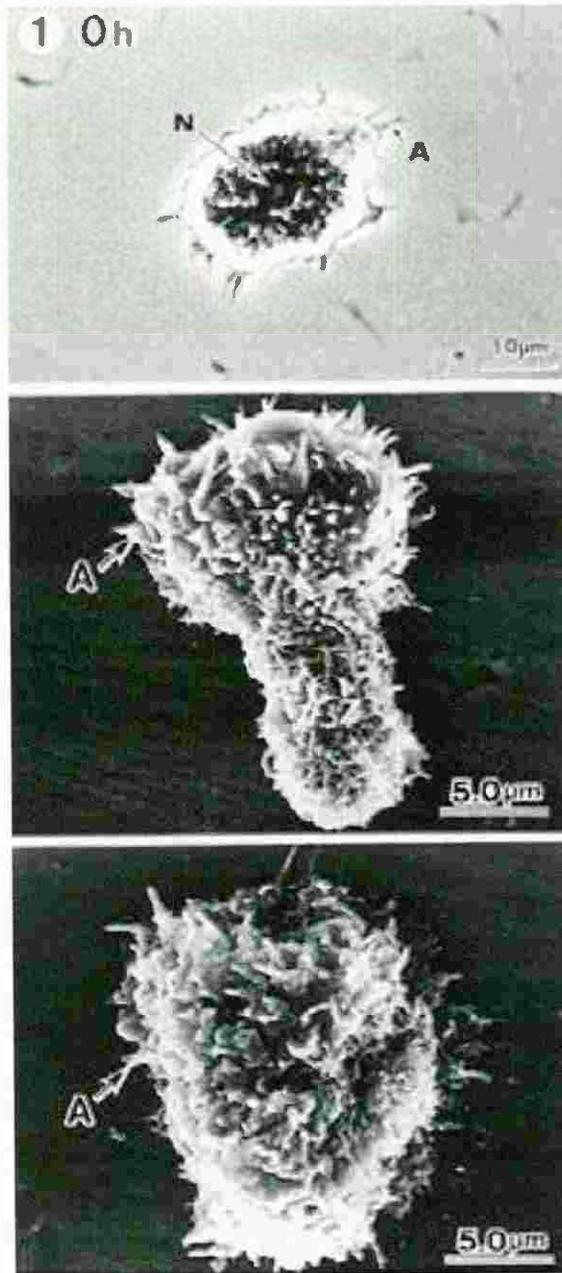
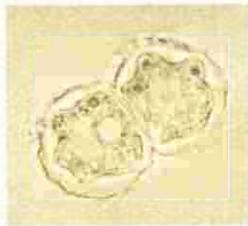


Figura 4. Trofozoito de *Acanthamoeba*. N: núcleo, A: acantópodo (Ortega-Rivas, 2002).

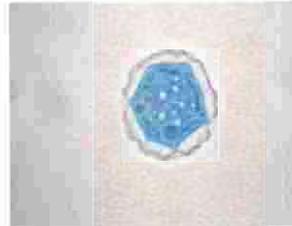
Grupo I

Grupo II

Grupo III



a) *A. astronyxis*



b) *A. castellani*



c) *A. polyphaga*



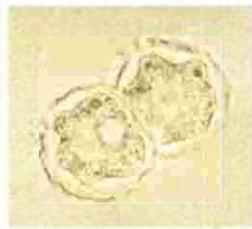
d) *A. culbertsoni*

Figura 5. Quiste de *Acanthamoeba* (Archelli y Kozubsky, 2003)

Grupo I

Grupo II

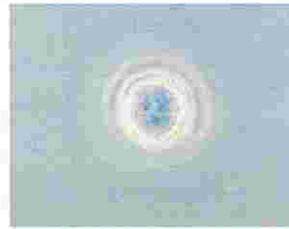
Grupo III



a) *A. astronyxis*



b) *A. castellani*



c) *A. polyphaga*



d) *A. culbertsoni*

Figura 5. Quiste de *Acanthamoeba* (Archelli y Kozubsky, 2003)



Figura 6. Lesiones cutáneas por *Acanthamoeba* en caso de encefalitis amibiana granulomatosa (Oddó, 2006).

El quiste es la fase latente identificable de *Acanthamoeba*. Presenta formas variables ya sea redondo, estelar, triangular, poligonal u ovalado. Esta forma se produce debido a que las condiciones del medio ambiente resultan sumamente adversas para este protozooario pudiendo ser por desecación, falta de alimento, pH inadecuado y presiones parciales de oxígeno bajas (Oddó, 2006).

Morfología

Los trofozoitos son pleomórficos, tienen unos segmentos alargados que se asemejan a espinas llamadas acantópodos. Los trofozoitos varían de tamaño con promedios de 20-40 μm , pero los de mayor tamaño son: 21-45 μm para *A. castellani*, 25-60 μm para *A. astronixes* y 14-41 μm para *A. polyphaga*. Tienen citoplasma abundante de aspecto granular y vacuolar, tienen un núcleo claro, central y esférico con un nucléolo prominente y denso (Figura 4), el citoplasma es granular con numerosas vacuolas alimentarias alrededor del núcleo, son contráctiles y vacían su contenido acuoso a intervalos de 40-50 segundos (Ortega-Rivas, 2002).

Los quistes de *Acanthamoeba* son esféricos con doble pared; la pared externa es lisa y la pared interna suele presentar variabilidad en su forma pudiendo ser globular, estelar o poligonal. Miden alrededor de 10-25 μm de diámetro (Figura 5) (Archelli y Kozubsky, 2003).

Clínica de Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EGA) y Queratitis Amibiana (QA)

Cuadro Clínico

La EAG es una infección subaguda, donde la vía de entrada e invasión al sistema nervioso central es hematogena, ésta enfermedad ocurre en personas de todas las edades sin predilección racial o de género, en pacientes inmunocomprometidos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), lesiones cutáneas, desnutrición anemia, etc. Este cuadro puede presentarse con un foco primario en la piel o en el tracto respiratorio, por inhalación de aire, aerosoles y polvo que contengan quistes o trofozoitos de *Acanthamoeba*. La QA es un proceso inflamatorio crónico activo producido exclusivamente por *Acanthamoeba*, la cual afecta a la córnea asociándose a un traumatismo corneal y a la exposición a contaminantes (Oddó, 2006).

En el caso de EAG los síntomas más comunes son anomalías del estado mental, letargo, cefalea, hemiparesia, cerca de la mitad de los casos presentan fiebre y en menor grado náuseas, vómito, anorexia, ataxia y afasia; algunos pacientes presentan lesiones cutáneas ulceradas (Figura 6). El curso de la enfermedad puede ser subagudo o crónico con una duración de 7 a 120 días (Oddó, 2006).

En la QA, los signos y síntomas derivan de una abrasión corneal que remeda la queratitis viral. Los síntomas empiezan con dolor creciente, epífora, fotofobia. Otros pacientes pueden presentar queratitis puntata, erosiones, opacidades subepiteliales o infiltrados, irregularidades, líneas o sollevamientos corneales, si no se sospecha el diagnóstico, el tratamiento



Figura 6. Lesiones cutáneas por *Acanthamoeba* en caso de encefalitis amibiana granulomatosa (Oddó, 2006).

convencional no funcionará y contraerá complicaciones como conjuntivitis, uveítis y hasta la pérdida de la vista con destrucción corneal. Un anillo estromal se desarrolla en más de dos tercios de los individuos afectados que aparecen como un infiltrado o absceso corneal(Figura 7). Si ésta condición es reconocida puede dar lugar a un diagnóstico temprano(Oddó, 2006).

Diagnóstico

El diagnóstico de EAG es sospechado clínicamente en base a la historia del paciente y los síntomas, pero la demostración e identificación de la amiba en los tejidos o fluidos corporales es requerida para su confirmación. Las muestras se toman en medio salino de Page y se siembra en agar no nutritivo cubierto por *E. coli* (NNE). Las muestras o fragmentos de biopsias son colocados sobre las placas e incubados a temperatura ambiente. De estos mismos cultivos, se hacen soluciones en fluido salino para observar las amibas en fresco. Se tiñen con tinción tricrómicas, Papanicolaou, Giemsa y hematoxilina-eosina (Oddó, 2006).

Acanthamoeba puede ser identificada en preparaciones húmedas de LCR en base a su morfología. Los acantópodos diferencian a *Acanthamoeba* de *Hartmannella* y *Balamuthia*; mientras que la ausencia de flagelos descarta a *Naegleria*. Las anomalías en el laboratorio más significativas en el examen de líquido cefalorraquídeo (LCR) se presentan en la Tabla 3.

Los quistes de *Acanthamoeba* son fáciles de identificar con tinción de hematoxilina-eosina por su pared gruesa la cual, no se tiñe y tiene una apariencia refringente y su gran variabilidad de formas fácilmente distinguibles. El núcleo aparece teñido intensamente de violeta (Figura 8).



Figura 7. Lesiones ocasionadas por *Acanthamoeba* encaso grave de queratitis amibiana (Oddó, 2006).

Tabla 3. Resultados observados en un examen de LCR en un paciente con EAG (Oddó, 2006).

Parámetro	Observación
Pleocitosis	20-100% de linfocitos
Glucosa	Ligeramente normal
Proteínas	Aumentadas
Polimorfonucleares(PMN)	Disminuidos
Tomografía, angiograma y pruebas con Galio	Lesiones graves vasculares en cerebro, cerebro medio, cerebelo e incluso en la médula espinal.

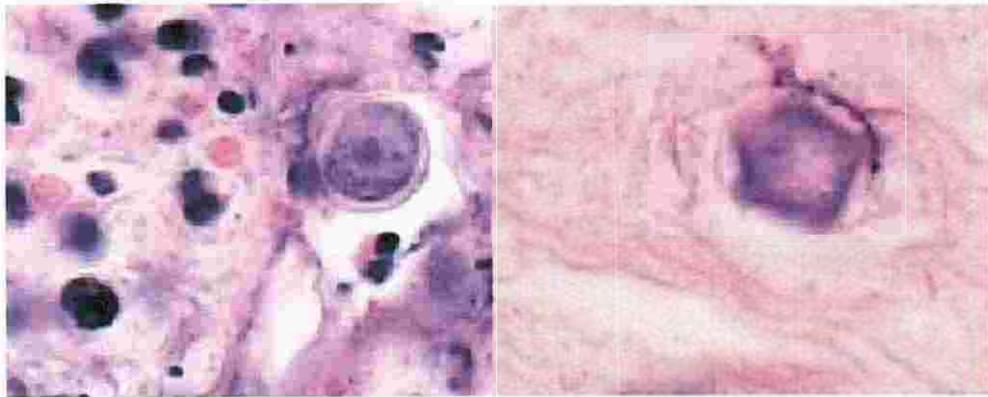


Figura 8. Queratitis Amibiana. Tejido corneal necrótico y destruido. Quistes esféricos y poligonales de *Acanthamoeba* spp. (H & E X 1250, aumento original) (Oddó, 2006).

El hallazgo patológico característico consiste en lesiones hemorrágicas, necróticas, multifocales y una reacción granulomatosa, pudiendo estar o no presente estos granulomas, los cuales, están ausentes en sujetos inmunosuprimidos. Además también son de gran utilidad la inmunofluorescencia directa e indirecta con anticuerpos específicos y PCR; mientras que, las resonancias y las tomografías son utilizadas para visualizar la localización y extensión de las lesiones (Oddó, 2006).

El diagnóstico de QA se puede hacer por medio de biopsias de epitelio (Figura 9), cultivos, tinciones con calco flúorblanco (permite observar el infiltrado inflamatorio, trofozoito y quistes), PCR, hibridación *in vitro* fluorescente, citometría de flujo y microscopía confocal (costosa y no siempre hay el equipo) (Konneman, 2001).

Tratamiento

En el tratamiento de las enfermedades producidas por amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* se tiene la utilización de 2 o 3 biocidas combinados como la mejor alternativa. Se han utilizado: Isetionato de propamidina, polihexametilen-biguanida (PHMB), gluconato de clorhexidina, isetionato de hexamidina, isetionato de dibromopropamidina (Brolene), clotrimazol, ketoconazol, miconazol, itraconazol, otros. Se consideran de elección: PHMB, gluconato de clorhexidina y Brolene.

La aplicación inicial es cada hora, posteriormente cada 2 a 3 horas y hacia el final se considera 4 veces al día, durante meses.

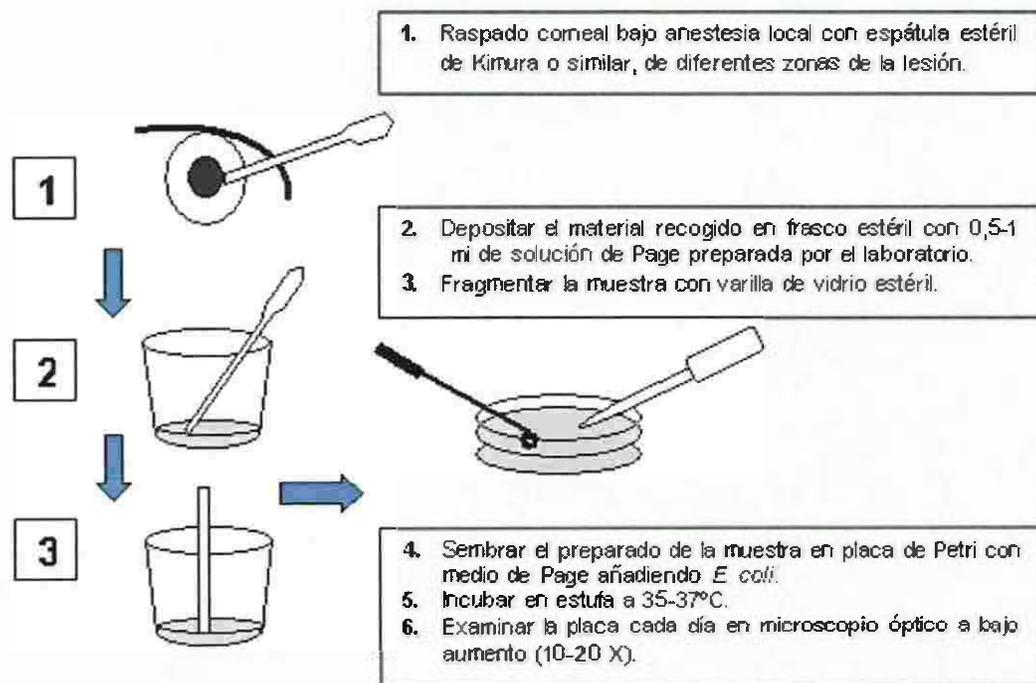


Figura 9. Procedimiento para muestreo de córnea y cultivo para identificación de *Acanthamoeba* en pacientes con queratitis (Pérez, *et al.*, 2003).

En el caso de QA algunos pacientes han sido tratados exitosamente, aunque aún se carece de un tratamiento óptimo. El pronóstico depende de la severidad del cuadro en el momento de la atención médica y del inicio temprano del tratamiento. Se han usado con buenos resultados medicamentos oftálmicos como el isocianato de propamidina y la dibromopropamidina. Se ha comunicado el uso de polimixina B, nitrato de miconazol, neomicina, neosporina, ketokonazol y clotrimazol, asociado al isotianato de propamidina. También hay casos en los que se ha demostrado un gran potencial curativo de la biguanida polihexametileno y los casos con extensa destrucción corneal requieren de una queratoplastia (Figura 10).

En ocasiones se ha recetado dexametasona que son esteroides que ayudan a promover el desenquistamiento de la amiba, sin embargo, son medicamentos demasiado potentes poco aconsejables debido a sus graves efectos secundarios (Oddó, 2006).

Profilaxis

Es muy difícil realmente evitar esta patología debido a que es un protozoo oportunista que ataca a personas inmunosuprimidas. De Jonckheere y Van de Voorde informaron que los quistes de algunas cepas de *Acanthamoeba* son altamente resistentes al cloro y no son destruidas por las concentraciones usuales de cloro mantenida en los suministros de aguas municipales o domésticos, o en las piscinas cloradas.

En el caso de QA los portadores de lentes de contacto blandos deben extremar la higiene y tener en cuenta los riesgos que entraña el uso de soluciones salinas de fabricación casera sin esterilizar. En la Figura 11 se muestra un ejemplo de productos de limpieza adecuados para la higiene de los lentes de contacto blandos (Oddó, 2006).



Figura 10. Tratamiento utilizado para EAG y QA.
(www.saval.ci/link.cgi/Productos/Medicamentos/273)



Figura 11. Productos de limpieza para lentes de contacto blandos
(www.lapislazuli.es)

Epidemiología de EAG y QA en México

Las AVL se encuentran en todo el mundo y se cree las infecciones de éstas han ocurrido desde el inicio de los tiempos. Dado el avance de las últimas décadas es que se ha dado su reconocimiento, en esta la era antimicrobiana. El SIDA es el que ha marcado mayor importancia en las acantamebias debido a su capacidad de inmunosuprimir y predisponer a infecciones a pacientes dando como resultado una alta morbilidad y mortalidad.

Los quistes de *Acanthamoeba* se han encontrado en el aire, la tierra y agua por lo que, las infecciones en humanos se pueden adquirir casi en cualquier parte; aunque mayoritariamente son adquiridas a través de la vía aérea superior y por contacto de mucosas expuestas como es la conjuntiva. Incluso se han aislado de la flora normal humana.

En México se han reportado cinco casos de Queratitis Amibiana(QA) y tres casos de Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) por *Acanthamoeba* spp. Además las patologías registradas por AVL se dicen que son subregistradas porque nunca son los casos que realmente se presentan, ya que se llegan a reportar con otro diagnóstico (Oddó, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de Muestreo

El muestreo y análisis se hizo en Cd. Obregón, Sonora. Ciudad que está ubicada al sur del estado, a 50 km de la costa del Mar de Cortés y 115 km de la sierra alta (arriba de los 1500 msnm), dista 240 km de Hermosillo, la capital del estado. Las coordenadas son 27°29' latitud norte y 109°59' longitud oeste. Con una altitud sobre el nivel del mar de 40,8 m en el centro.

Se realizaron 2 muestreos, uno durante los meses mayo-agosto de 2010, cuando las temperaturas de la región son las más altas de la época en la que se incrementan las actividades acuáticas en la zona y el otro muestreo entre los meses diciembre-enero de 2011, periodo en que las temperaturas son ligeramente más bajas. Los muestreos se realizaron en diferentes puntos de la ciudad, en la laguna Nainari, Kino y 200 y canal Morelos por mencionar algunos (Figura 12).

Preparación de Medios de Cultivo

Los medios de cultivo se prepararon en el laboratorio de biología molecular y de Ecodesarrollo del Instituto Tecnológico de Sonora campus centro, ubicado por el Boulevard Rodolfo Elías Calles entre Chihuahua y 5 de Febrero, Figura 13.

Posteriormente se preparó el agar no nutritivo, disolviendo 15 gr de Bacto Agar en 1000 ml de agua destilada, se calentó e hirvió por 1 minuto.

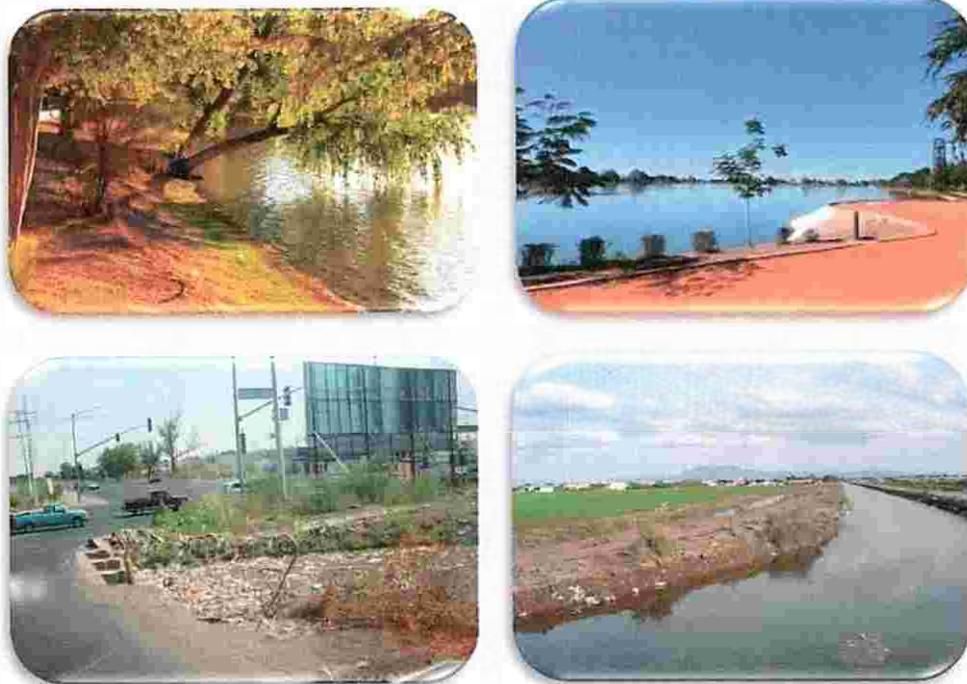


Figura 12. De izquierda a derecha: Laguna Nainari (muestra tierra), laguna Nainari (muestra agua), Kino y 200(muestra tierra) y canal Morelos(muestra agua y tierra)

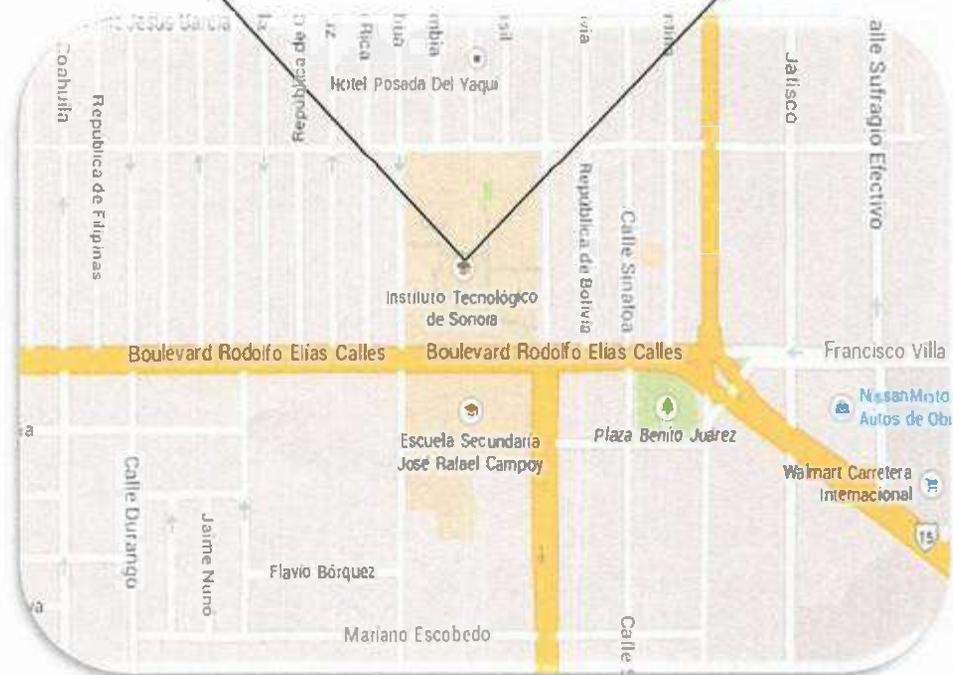


Figura 13. Instituto Tecnológico de Sonora, campus Centro.

Después se esterilizó a una temperatura de 121°C por 15 minutos. Una vez templado (45-50°C) se vació en cajas de Petri estériles, bajo la campana de flujo laminar (Cortéz-Rocha, 2007).

Posteriormente se le agregó 0.5 ml de la suspensión de *E.coli*, la cual se homogenizó por dispersión con varilla de vidrio acodada, hasta la absorción de la suspensión. Las placas de NNE se conservaron en refrigeración hasta su uso, Figura 14.

Muestreo

Se tomaron un total de 40 muestras de agua y suelos en diferentes puntos de la ciudad, de las cuales las primeras 30 fueron tomadas durante los meses mayo a agosto de 2010 en los que por las altas temperaturas el crecimiento ambiental es mayor, así como el riesgo de infección por las constantes actividades acuáticas que esto conlleva; y 10 muestras fueron tomadas en los meses de diciembre de 2010 y enero de 2011, periodo de tiempo donde las temperaturas son ligeramente más bajas. En la Tabla 4 se describe el tipo de muestra recolectada y su ubicación de muestreo, la muestra 16 proviene de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente de QA.

Las muestras líquidas se tomaron en las orillas, agitando previamente el fondo y dejando sedimentar las partículas grandes de tierra, posteriormente se recolectó el agua en frascos o tubos plásticos para muestras ambientales estériles (Cortez-Rocha, 2007). Las muestras sólidas se tomaron alrededor de 10gr en un tubo de ensaye estéril (La muestra se tomó de un área húmeda que se encuentre cerca de la materia orgánica de la cual, la amiba

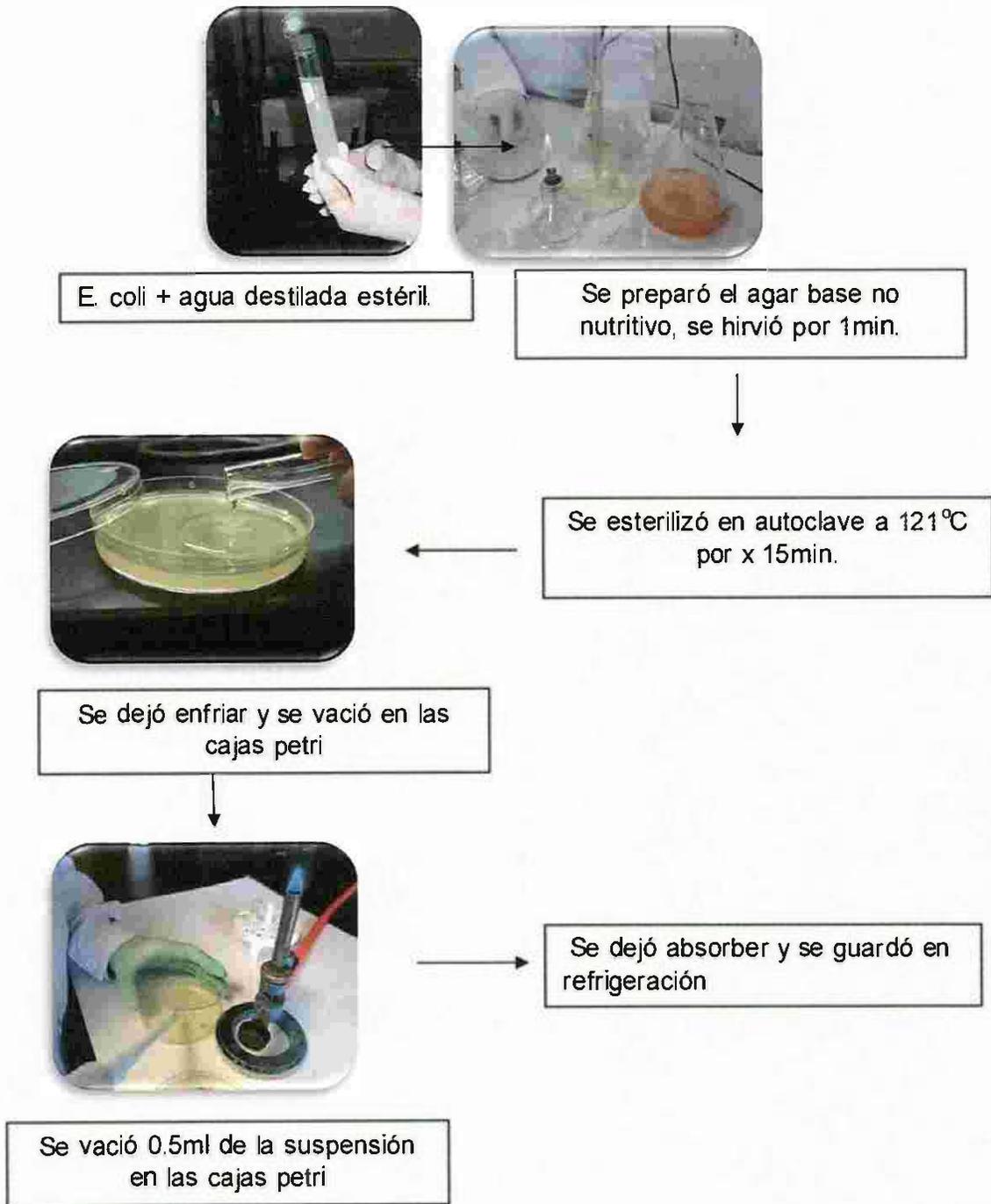


Figura 14. Preparación del medio de cultivo para AVL.

Tabla 4. Tipo de muestras recolectadas y su ubicación.

No	Sitio	Origen
1	ITSON	tierra
2	ITSON	tierra
3	Charco 200 y 5 de Febrero.	agua
4	Plaza 200	tierra
5	300 y Michoacán	agua
6	Kino y 300	tierra
7	Kino y 300	agua
8	Laguna Náinari	agua
9	Laguna Náinari	tierra
10	Canal Morelos	agua
11	Canal Morelos	tierra
12	Parque Pioneros	tierra
13	Canal Calzada y Veracruz.	tierra
14	Canal Calzada y Veracruz.	agua
15	Hotel San Jorge	tierra
16	Caso Clínico	LCR
17	Estanque no.1(baja densidad)	agua
18	Coyote	agua
19	Pila de agua	agua
20	ITSON centro	agua
21	200 y Blvd. Colonial	agua
22	200 y Kino	agua
23	200 y Blvd. Colonial	tierra
24	ITSON	tierra
25	Pila	agua
26	Blvd. Colonial y Jesús García.	tierra
27	Kino y 200	tierra
28	Laguna(limpia)	tierra
29	Laguna(limpia)	agua
30	Jardinera discóbolo	tierra
31	Jardinera Urbi	tierra
32	toma de agua Laguna Náinari	agua
33	Laguna Náinari(limpia)	agua
34	Canal 2 y 200	tierra
35	Canal 2 y 300	tierra
36	Club de golf	agua
37	Laguna	tierra
38	Centro bancario	agua
39	Parque col. Del Valle	tierra
40	Kino y 200	tierra



Figura 15. Campana de flujo laminar.

Procesamiento

En la Figura 16 se muestra un esquema general del procesamiento de muestras y análisis para el aislamiento e identificación de amibas de vida libre (AVL). Las muestras líquidas se homogenizaron y se tomó una alícuota de 50ml de agua de cada una. Se centrifugó a 1500rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante por decantación y se dejó aproximadamente entre 1- 2ml y se transfirió a cajas con NNE (De Jonckheere, 1979).

Con las muestras sólidas se tomaron alrededor de 10-15gr de muestra en un tubo de 50 ml y se hizo una mezcla con agua destilada estéril. Se tomó 0.50ml de la muestra y se sembró directamente sobre el cultivo de NNE. Se incubó a 37 °C por 24-48 hrs. Se seleccionaron las áreas de crecimiento y se re-aislaron en nuevas placas con NNE. Se hicieron resiembras periódicas hasta lograr cultivos libres de hongos (De Jonckheere, 1979).

Identificación de Aislamientos

La identificación de aislamientos se elaboró mediante la observación de las características morfológicas de los quistes y trofozoitos, además de pruebas de tolerancia a diferentes temperaturas de incubación. El análisis morfológico fue apoyado utilizando el atlas de amibas de vida libre elaborada por Page en 1988.

Prueba de Temperatura y Medición de Trofozoitos y Quistes

Para determinar la capacidad que tienen los aislamientos de *Acanthamoeba* de crecer a diferentes temperaturas de incubación, los cultivos monoxénicos

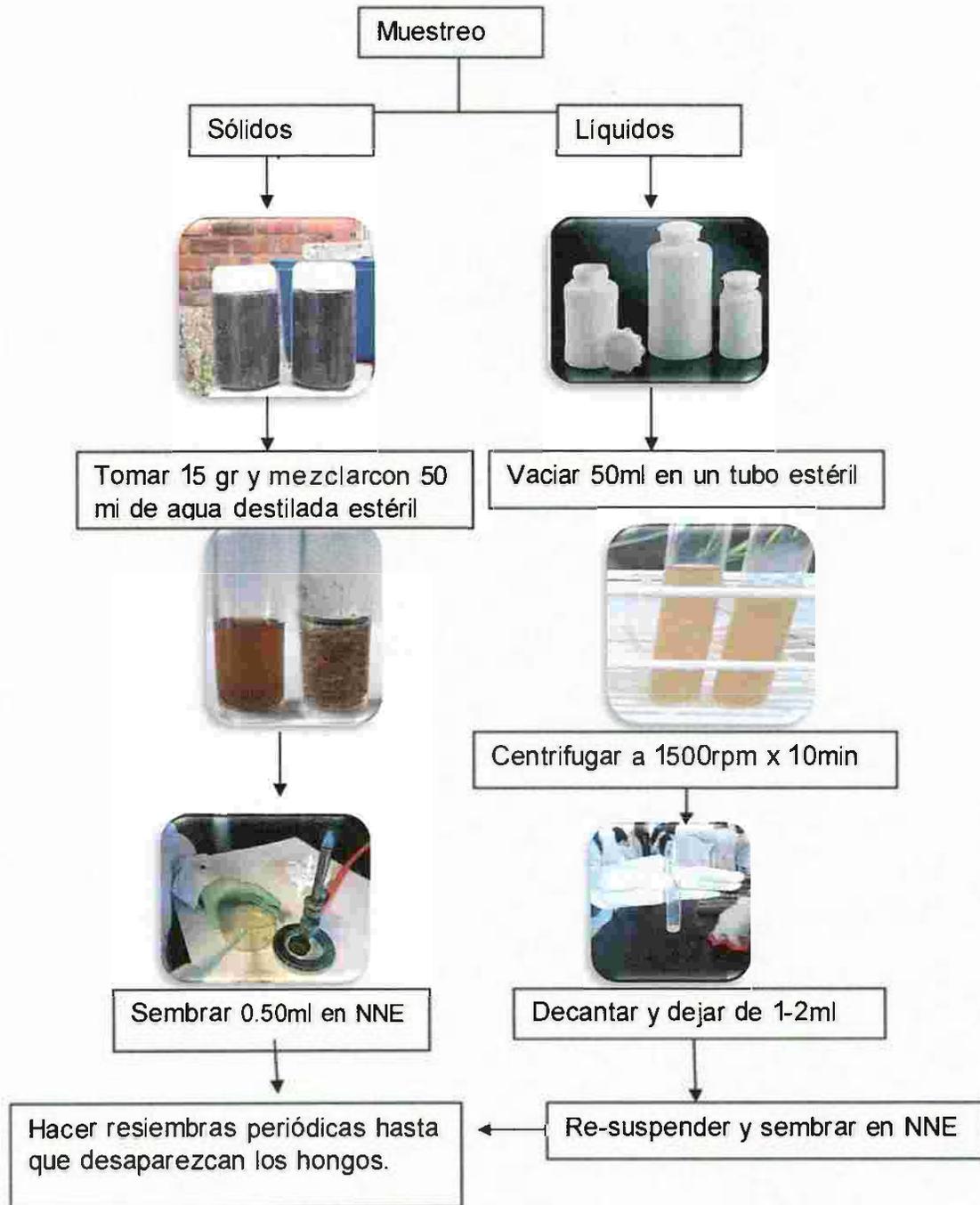


Figura 16. Procesamiento general de muestreo.

se triplicaron e incubaron a 26, 37 y 45 °C, para obtener datos útiles en la identificación a nivel especie (Cortéz-Rocha, 2007).

Para medir los quistes y trofozoitos se escogió un área de 1cm² de la muestra de las cepas sospechosas a medir. Se tomó una asada y se llevó a un portaobjetos, el cual previamente contenía una gota de agua destilada estéril. Se colocó el cubreobjetos y se observó en microscopio invertido con objetivo 10x. Las mediciones se realizaron a 10 trofozoitos y a 10 quistes para tomar un promedio de cada una de las cepas analizadas, Figura 17(Oddó, 2006).

Prueba de Tolerancia a Salinidad

De acuerdo con Bootonet *al.* (2004), existe una relación entre la patogenicidad, la capacidad de crecer a temperatura ambiente normal y la tolerancia a la salinidad. La prueba de tolerancia a salinidad se realizó a todos los aislamientos de *Acanthamoeba* que crecieron a 37°C o temperaturas mayores. Los aislamientos se sembraron en placas de NNE que contenían concentraciones de 0%, 1%, 2%, 3.2% y 3.5% de NaCl. Se incubaron a 37°C y se revisaron cada 6 horas para medir la distancia (mm) recorrida las amibas sospechosas. En la Figura 18, se muestra la medición del crecimiento de *Acanthamoeba* a diferentes concentraciones de salinidad.

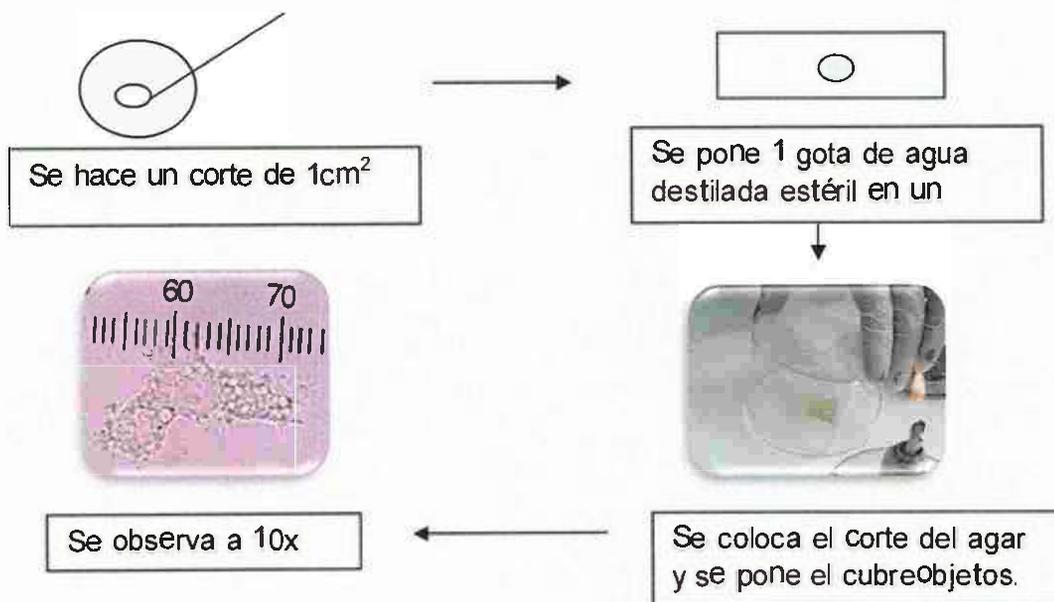


Figura 17. Prueba de medición de trofozoitos.

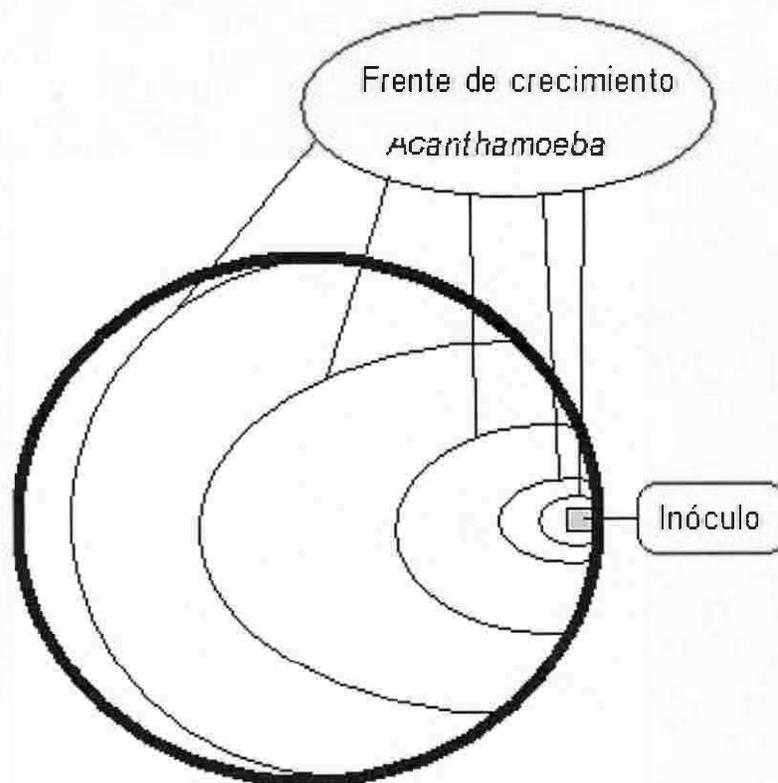


Figura 18. Medición del crecimiento de *Acanthamoeba* a diferentes concentraciones de salinidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se tomaron un total de 30 muestras en los meses de mayo a agosto de 2010, de las cuales 14 fueron de agua, 15 de suelo y una de líquido cefalorraquídeo. De las muestras que se tomaron en los meses de diciembre de 2010 y enero de 2011, 6 fueron de suelo y 4 de agua.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que en todas las muestras de agua y suelo resultaron positivas a AVL, debido a los sitios de muestreo señalados en la Tabla 4, ya que la mayoría fue tomada de canales, donde las AVL suelen alimentarse de bacterias, levaduras, hongos y microalgas, cuya abundancia en el medio ambiente propician su crecimiento.

Dentro de las AVL que se aislaron se identificaron morfológicamente varios géneros, pero que por no ser objetivo del trabajo se descartó su identificación a nivel especie.

De las 40 muestras procesadas, 11 mostraron morfología sospechosa a pertenecer al género *Acanthamoeba*, todas aisladas a una temperatura de 37°C. Las muestras que resultaron negativas correspondieron a cuerpos de agua que usualmente son tratados como algunas albercas de origen público, con lo cual obliga a los dueños o empleados mantener en régimen el mantenimiento de la piscina o balneario.

A las cepas se les hizo una de 26°C, 37°C y 45°C, con el fin de conocer entre los aislamientos si existían posibles cepas patógenas y/o cepas termofílicas cuyo dato resulta útil para la identificación de las amibas.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de crecimiento a diferentes temperaturas de incubación, se puede observar que hubo un crecimiento en las diversas temperaturas. También se muestran los promedios de mediciones de quistes y trofozoitos de acuerdo al Atlas elaborado por Page, lo que indicala presencia de *Acanthamoeba* spp.

La identificación de los aislamientos de *Acanthamoeba* spp se elaboró mediante la observación de la morfología de los quistes y los resultados de pruebas de temperaturas y claves taxonómicas tomadas del atlas de amibas de vida libre elaborada por Page en 1988. Los resultados de las especies de *Acanthamoeba* identificadas se muestran en la Tabla 6.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de las cepas sospechosas a la prueba de tolerancia de salinidad con placas de NNE conteniendo 0%, 1%, 2%, 3.2% y 3.5% de NaCl. Las mediciones del desplazamiento de las amibas se hicieron cada 6 horas. En la Figura 20 semuestra la diferencia en velocidades de desplazamiento de las diferentes cepas a diferentes concentraciones de NaCl.

La cepa M8 que proviene de una muestra de agua se obtuvo la mayor velocidad de desplazamiento que fue de 5mm/h y comparándola con los valores obtenidos por Booton *etal.*, (2004), la velocidad máxima de 5mm/h aproximadamente, los datos máximos son literalmente enormes

Tabla 5. Características de crecimiento y análisis de por medición de trofozoitos y quistes de las cepas de sospechosas de *Acanthamoeba* spp.

Muestra	26°C	37 °C	45 °C	Quiste (µm)	Trofozoito (µm)
M3	(+)	(+)	(+)	11.28	38.54
M7	(+)	(+)	(-)	17.1	27.73
M8	(+)	(+)	(+)	15.22	21.62
M13	(+)	(+)	(+)	23.31	38.54
M16	(+)	(+)	(+)	13.53	30.08
M17	(+)	(+)	(+)	12.87	28.67
M30	(+)	(+)	(+)	15.98	28.76
M31	(+)	(+)	(+)	13.53	23.50
M36	(+)	(+)	(+)	13.16	26.32
M38	(+)	(+)	(+)	11.56	21.15
M39	(+)	(+)	(+)	10.71	21.62

Tabla 6. Especies de *Acanthamoeba* identificadas por morfología y fisiología.

Cepa	Morfología/Endoquiste	Grupo	Especie
M3	Estelar	II	<i>A. rhyodes</i>
M7	Poligonal	II	<i>A. rhyodes</i>
M8	Poligonal	III	<i>A. royreba</i>
M13	Poligonal	I	<i>A. tubiashi</i>
M16	Poligonal/estelar	II	<i>A. castellani</i>
M17	Poligonal	II	<i>A. lugdunensis</i>
M30	Poligonal	I	<i>A. gigantea</i>
M31	Poligonal	II	<i>A. lugdunensis</i>
M36	Redondo	III	<i>A. lenticulata</i>
M38	Triangular	II	<i>A. triangularis</i>
M39	Poligonal	II	<i>A. lugdunensis</i>

Tabla 7. Desplazamiento (mm) de *Acanthamoeba* a diversas concentraciones de NaCl.

Muestra	0%	1%	2%	3.2%	3.5%
M3	1.85	1.2	0.6	0.25	0
M7	3.2	2.7	2.6	0	0
M8	1	5	4	0.5	0
M13	1.6	1.3	1.2	0.5	0.4
M16	1.6	0.6	0.6	0.3	0.18
M17	2	0.4	0.11	0.5	0
M30	0.9	0.7	0.4	0.2	0.18
M31	1.65	0.34	0	0	0
M36	1	0.7	0.7	0	0
M38	1.3	0.92	0.23	0.1	0
M39	1.3	0.55	0.5	0	0

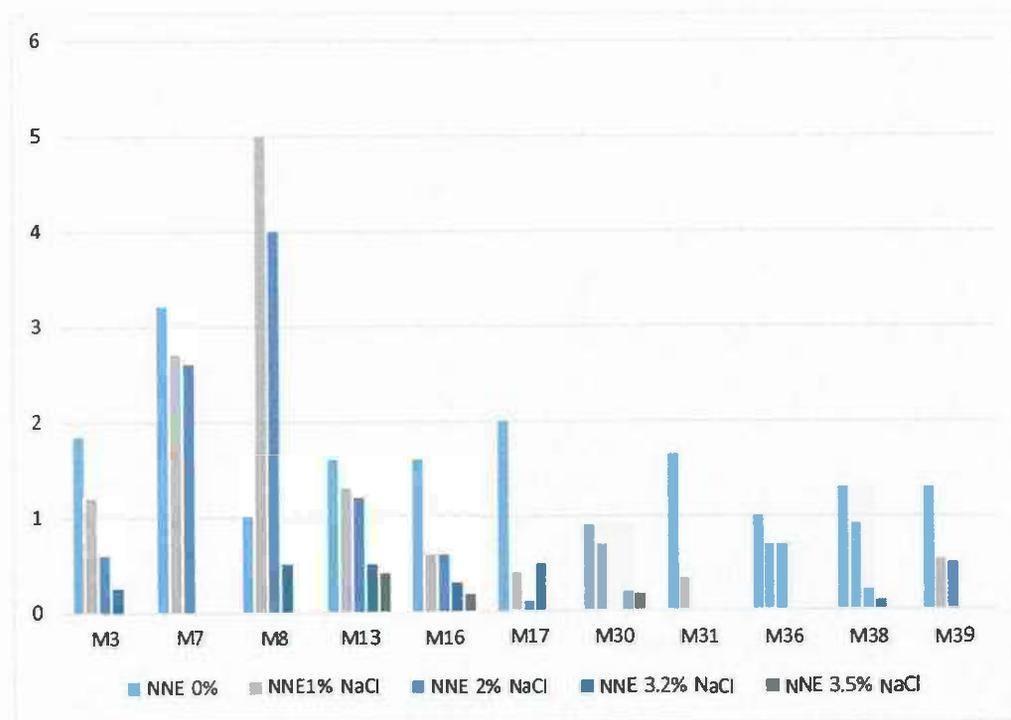


Figura 19. Velocidad de desplazamiento de *Acanthamoeba* a diferentes concentraciones de NaCl.

Las cepas que crecieron en todas las concentraciones de sal fueron las cepas M13 y M30a partir de muestras de suelo provenientes del cierre de compuertas del canal alto, de una jardinera de la estatua "Discóbolo" y la cepa M16 proveniente de la muestra de LCR.

Cepas de *Acanthamoeba lugdunensis* y *Acanthamoeba Castellani* que han sido reportadas como patógenas fueron aisladas e identificadas en las muestras M17, M31 Y M39 para *Acanthamoeba lugdunensis* y en la muestra M16 para *Acanthamoeba Castellani*.

Las cepas M3, M8, M17 y M38 crecieron hasta la concentración de 3.2% a excepción de la cepa M31 que creció hasta la concentración de 1% de salinidad, crecieron todas las cepas en su totalidad similarmente, por lo que se evidencia su fácil crecimiento en medios de salinidad semejante o en condiciones fisiológicas parecidas como es el caso de las condiciones normales del ojo humano con 1% de salinidad y una temperatura de 37°C, indicando también que bajo este sistema de identificación pueden existir especies que de hecho pertenezcan a ciertos genotipos que tengan la característica de reunir la mayoría de las cepas patógenas, como lo es el caso de los del genotipo T4, por lo que resultara determinante la prueba de genotipificación en los aislamientos y corroborar o descartar su patogenicidad.

CONCLUSIONES

En esta investigación, en base a los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación mediante los análisis fisiológicos y morfológicos se encontraron cepas del genero *Acanthamoeba*. De las 40 muestras analizadas 11 fueron identificadas del genero *Acanthamoeba* spp. Las 29 restantes pertenecieron a otros géneros.

De las muestras del genero *Acanthamoeba* se identificaron las especies de *A. castellani*, *A. rhyodes*, *A. royreba*, *A. tubiashi* y a *A. gigantea* por primera vez en la región, quedó pendiente la confirmación por genotipación.

La variedad de las muestras analizadas permitió aislar una mayor diversidad de especies de *Acanthamoeba*. Los resultados coinciden con los reportados por Cortez-Rocha en el 2004, debido a las condiciones ambientales de la región, semidesértica con diversidad de orígenes y altas temperaturas en verano, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las amibas de vida libre, entre ellas amibas patógenas como algunas especies del genero *Acanthamoeba*.

R.T.170029

BIBLIOGRAFIA

1. Alsam, S., Kim, K. S., Stins, M., Rivas, A. O., Sissons, J., Khan, N.A. 2003. *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog.* 35(6). 235-41.
2. Archelli, S. y Kozubsky, L. 2003. *Afecciones del Sistema Nervioso Central. Amebas de Vida Libre. 2da Parte.* Fundación Bioquímica Argentina.
3. Ayala, J. y Peralta, M. L. 2009. *Amibas de vida libre en seres humanos.* *Salud Uninorte*, Vol. 25, Núm. 2, pp. 280-292
4. Booton GC, Rogerson A, Bonilla TD, Seal DV, Kelly DJ, Beattie TK, Tomlinson A, Lares-Villa F, Fuerst PA, Byers TJ. 2004. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J Eukaryot Microbiol.* 51(2). 192-200.
5. Cortez-Rocha, A. 2007, *Biodiversidad de Acanthamoeba* en muestras de diversos tipos de agua y suelo de ambientes semidesérticos.
6. De Jonckheere JF. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann Microbiol (Paris).* 130B(2). 205-12.
7. Gertiser, M. L., Giagante, E., Sgattoni, E., Basabe, N., Rivero, F., Luján, H., Occhionero, M., Paniccia, L., Visciarelli, E., Costamagna, S. R. 2010. *Acanthamoeba* sp. keratitis: first case confirmed by isolation

- and molecular typification in Bahía Blanca, Buenos Aires Province, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 42(2) 122-5.
8. Hurt M, Apte S, Leher H, Howard K, Niederkorn J, Alizadeh H. 2001. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect Immun.* 69(5). 2988-95.
 9. Konneman, E. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Medica Panamericana, 5ta edición. Pág. 1432.
 10. Konneman, E. 2001. Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas a Color Editorial Medica Panamericana, 5ta edición. Pág. 225
 11. Lawrence, M., Tiemey, J., Stephen, J., Mcphee, M., Papadakis A. 2005. Diagnóstico Clínico y Tratamiento. Editorial Manual Moderno, 40va edición. Pág. 1535.
 12. Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.*16(2). 273-307. Review.
 13. Oddó, D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos.
 14. Ortega-Rivas, A. 2002. Aplicación de la Técnica Rapd para la caracterización de especies del género de *Acanthamoeba*.

15. Page, C. F. 1988. A New key to Freshwater and Soil Gymnansoebae. Culture Collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association.
16. Pérez-Irezábal, J., Isasa, P., Barrón, J., Martínez, I. 2003. Queratitis por Acanthamoeba. Servicios de Microbiología, Parasitología y de Oftalmología. Pp. 1-9
17. Suarez, R., Espinoza, Y., Villanueva, C., Ramos, J., Huapaya, P., Marquina, R. 2002. Aislamientos de amebas de vida libre del genero Acanthamoeba a partir de fuentes de agua en la ciudad de Ica. Canales de la Facultad de Medicina
18. CDC en Español. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. 2013. Acanthamoeba-granulomatosa amebiana Encefalitis (GAE); Queratitis. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/>
19. Lapis Lazuli España Otical Services, S.L. Disponible en: www.lapislazuli.es/productos/productos.htm
20. Laboratorios SAVAL. 2015. Santiago de Chile. Disponible en: www.savall.cl/link.cgi/Productos/Medicamentos/273