

---

## Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora

L.F. Lares-Jiménez\*, F. Lares-Villa

Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, Cd. Obregón, Sonora, C.P. 85000.

---

*Free-Living Amoebae Isolation from Surface Fresh Water in Valle Del Mayo, Sonora*

### Abstract

Free living amoebae have acquired medical importance since the 1970's due to the discovery of their pathogenicity in humans and animals. The genus *Naegleria* is outstanding by owning the species of *Naegleria fowleri*, which causes primary amebic meningoencephalitis (PAM) disease of fast and fatal evolution in humans, and other mammals; besides *Naegleria fowleri*, there are other two amoebae that cause granulomatous amebic encephalitis (GAE) which are *Acanthamoeba* spp. and the recently discovered *Balamuthia mandrillaris*. The aim of this study was to identify the genus of native free living amoebae in Valle del Mayo, Sonora; as well as the deliberate search of *Naegleria fowleri*. 10 sampling sites were selected in October of 2007. Trophozoite and cyst morphology, amebo-flagellate transformation, thermo-tolerance, and molecular tests criteria were used to identify the stocks. From the 91 isolated stocks, 14 were positive to flagellation. Of these, 5 grew at 45°C, and 9 grew in a range between 20°C and 37°C. DNA was extracted from 5 suspicious stocks and was treated for polymerase chain reaction (PCR) test to compare it with *Naegleria fowleri* positive controls and examine their similarity. The result revealed that the isolations corresponded to other thermophilic species of *Naegleria*. Deliberated search of these pathogenic free living amoebae is recommended to be continued.

*Key words:* amoebae, *Naegleria*, isolates, Mexico.

### Resumen

Las amebas de vida libre han cobrado importancia médica desde 1970, debido al descubrimiento de su patogenicidad en humanos y animales. El género *Naegleria* se ha destacado por poseer a la especie *Naegleria fowleri*, que causa en humanos la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), enfermedad de evolución rápida y fatal; además de *Naegleria fowleri*, otras dos amebas causan encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) los cuales son *Acanthamoeba* spp. y la recientemente descubierta *Balamuthia mandrillaris*. El objetivo de este estudio fue el identificar géneros de amebas de vida libre nativos en el Valle del Mayo, Sonora; así como la búsqueda intencionada de *Naegleria fowleri*. Se seleccionaron 10 sitios de muestreo en el mes de octubre de 2007. Para la identificación de las cepas se utilizaron criterios de morfología de trofozoito y quiste, prueba de transformación amebo-flagelar, pruebas de termotolerancia y pruebas moleculares. De las 91 cepas aisladas, 14 resultaron positivas a la prueba de flagelación. De estas, 5 crecieron a 45°C y 9 crecieron en un rango de temperatura entre 20°C y 37°C. A 5 cepas sospechosas se les extrajo el ADN y se trataron con la técnica de PCR para compararlas con cepas de *Naegleria fowleri* y examinar su semejanza. El resultado reveló que los aislamientos correspondieron a otras especies de *Naegleria* termofílicas. Se recomienda continuar con la búsqueda intencionada de estos organismos.

*Palabras clave:* amibas, *Naegleria*, aislamientos, México.

---

\*Autor de correspondencia  
E-mail: luisfdolares@hotmail.com.

## Introducción

Existen 4 géneros de amebas de vida libre asociadas a enfermedad en humanos que afectan el sistema nervioso central (SNC): *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y el más recientemente identificado *Sappinia*.

En 1965, el primer reporte detallado de casos humanos fatales de meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) por *Naegleria fowleri* fue publicado por Fowler y Carter (Martínez, 1985). La MAP ocurre de manera más típica en niños y adultos jóvenes, los cuales con frecuencia tienen antecedentes de actividades en aguas cálidas. El periodo de incubación se calcula entre uno y quince días. Su curso es rápido y fatal, presentándose el fallecimiento de la gran mayoría de los pacientes en la primera semana después del inicio de los síntomas (Martínez y Visvesvara, 1997). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son las de una meningoencefalitis común con fiebre, cefalea intensa, náuseas, vómitos y signos de irritación meníngea. Se continúa con confusión, irritabilidad, episodios convulsivos, déficits neurológicos focales y coma (John, 1982).

El interés en la búsqueda de este patógeno derivó en el aislamiento de muchas cepas de *Naegleria*. Actualmente se han descrito 47 especies de *Naegleria*, gracias en gran parte, al uso de técnicas de biología molecular (De Jonckheere, 2002, De Jonckheere 2006).

A raíz de los casos de PAM detectados en el Valle de Mexicali, B.C. y el Valle del Yaqui, Son. (Guzmán-Fierros et al., 2008), cuyas características tanto climáticas como socioculturales se asemejan a las del Valle del Mayo, Son. y que anterior a esto no se contaba con este tipo de estudios en este valle. Estos estudios ayudarán a darse una idea de la fauna nativa de amebas patógenas como no patógenas e implementar posibles medidas de prevención a infecciones causadas por amebas patógenas.

## Material y métodos

### Muestreo

El muestreo se realizó el día 03 de noviembre de 2007 en 10 puntos diferentes donde la comunidad del Valle del Mayo acostumbra nadar. A estas muestras se les midió temperatura, pH y salinidad. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente mientras fueron llevadas ese mismo día al

laboratorio para su procesamiento.

### Aislamiento

Cada muestra se homogenizó y se centrifugó a 2500rpm por 15min. Se tiró el sobrenadante y el botón se vertió en placas con agar NNE. Se incubaron a 20°C, 37°C y 45°C. De 24 a 48hrs después se revisaron en busca de colonias de amebas y se sembraron en placas nuevas para tener cultivos puros y libres de contaminantes.

### Prueba de transformación flagelar

A placas con amebas en forma de trofozoitos y se les añadió 1ml de agua destilada estéril para bajar la concentración de nutrientes en el medio, así como proporcionar a las amebas un medio en el que se puedan desplazar con facilidad. Se dejaron incubar a 37°C por espacio de 4 horas con revisiones cada hora (Page, 1988).

### Prueba de crecimiento a diferentes temperaturas

Todas las muestras aisladas se sembraron y se incubaron a 20°C, 37°C y 45°C para calcular el rango de temperatura para cada muestra en el que se observaba crecimiento.

### Medición de trofozoitos y quistes

Se realizaron preparaciones en fresco de cada muestra y con la ayuda de un microscopio con un lente graduado, se tomaron medidas tanto de trofozoitos como de quistes para compararlos con los datos en la literatura.

### Identificación por morfología

Tras revisar los resultados de las pruebas de transformación flagelar, tolerancia a diferentes temperaturas y tamaño de trofozoito y quiste, se prosiguió a identificar morfológicamente a todas las muestras basándose en el atlas de amebas de vida libre "A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae" (Page, 1988).

### Obtención de cultivos axénicos

Tras revisar las muestras positivas a la prueba de transformación flagelar, que crecieran a 45°C y reunieran las características morfológicas y de comportamiento característicos al género *Naegleria*, se sembraron y pasaron a botellas estériles con medio Cerva (2% bacto-casitona, 10% suero fetal de ternera al adicionado con antibióticos) para obtener un cultivo axénico de amebas.

### Extracción y precipitación de ADN

Se despegaron las amebas y se transfirió el medio a viales de centrífuga para sedimentar las células a 5000rpm por 5-10min o a 8000rpm por 1-3min. Los pellets obtenidos fueron usados inmediatamente o congelados a -48°C hasta su uso. Se añadieron 500µl de amortiguador de lisis (NaCl, EDTA, TRIS-HCl, Tritón 100-X). Se incubó la muestra en baño maría por 10min a 95°C e inmediatamente se centrifugó a 16000rpm por 10min. Se transfirieron 200µl del extracto de la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5ml con 400µl de etanol al 95%. Este fue agitado brevemente en el vórtex para luego centrifugar a 16000rpm por 5min. Después se decantó el etanol y se dejó secar el precipitado. Posteriormente se disolvió el precipitado en buffer TE y las muestras quedaron listas para su amplificación.

### Técnica de PCR

A todos los aislamientos que crecieron a 45°C, provenientes de la búsqueda intencional de *Naegleria fowleri*, se les aplicó la técnica de PCR con primers o iniciadores diseñados para detectar *N. fowleri* (De Jonckheere, comunicación personal) con la siguiente secuencia:

Primer 1: NFFW, secuencia 5' a 3':

T G A A A C C T T T T T T C C A T T T A C A

Primer 2: NFRV, secuencia 5' a 3':

A A T A A A A G A T T G A C C A T T T G A A  
A

Se utilizaron perlas PuReTaq Ready-To-Go Veda Amersham, Biosciences, las cuales contienen estabilizador BSA, los nucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, aproximadamente 2.5 unidades de PuReTaq polimerasa y buffer de reacción. Cuando una perla es reconstituida a un volumen final de 25µl, la concentración de cada nucleótido es de 200µM en Tris HCl 10mM (pH 9.0 a temperatura ambiente), KCl 50mM y MgCl<sub>2</sub> 1.5mM. A cada perla se agregó lo siguiente:

- 22µl de agua bidestilada
- 1µl de primer NFFW
- 1µl de primer NFRV
- 1µl de muestra

El programa de temperaturas en el termociclador

(Techgene, modelo FTGENE5D) para cada uno de 30 ciclos fue el siguiente:

- Pre calentamiento a 94°C por 5min
- Desnaturalización a 94°C por 1min
- Alineamiento a 52°C por 1.5min
- Extensión a 72°C por 2min
- Extensión final 72°C por 5min

Para el corrimiento electroforético de los productos de PCR, se preparó 30ml de agarosa al 2% (SIGMA), agregándose 6µl de bromuro de etidio (0.6mg/ml). Para cargar las muestras en el gel, se mezclaron primero 2µl de tinte de carga más 8µl de producto de PCR. En el primer carril del gel se cargó 3µl del marcador de peso molecular (marca). El gel se corrió con buffer TAE al 0.5% con 100mV por 30 a 40min. Al término, el gel fue visualizado en transiluminador UV a 260nm de longitud de onda. La cámara electroforética utilizada fue el modelo Electrophoresis Sub System 70 de Labnet; la fuente fue el Power Station 300 de Labnet (Guzmán-Fierros *et al.*, 2008).

### Resultados y discusión

En los datos obtenidos de los lugares de muestreo podemos observar que la temperatura del agua fluctuó de los 25°C a los 32°C, el pH varió de 6.63 a 8.42 y la salinidad varió de 1.000 a 1.003 (Tabla 1).

**Tabla 1. Temperatura, pH y salinidad de las muestras de agua provenientes de distintos puntos de la Región del Mayo.**

Lugar de Muestreo	Temperatura	pH	Salinidad
M1	25 °C	8.42	1.002
M2	25 °C	7.85	1.003
M3	29 °C	7.80	1.002
M4	30 °C	8.00	1.001
M5	30 °C	7.05	1.002
M6	30 °C	7.85	1.000
M7	30 °C	7.97	1.000
M8	32 °C	6.63	1.000
M9	29 °C	8.17	1.000
M10	28 °C	8.32	1.001

En estudios realizados por Duarte-Ruiz (2007), sobre la calidad de aguas superficiales del cauce del Río Mayo, se reporta que los valores de pH fluctuaron entre 7.13 y 8.38, en muestreos hechos en el mes de mayo y menciona que las descargas que recibe el cauce son de origen pecuario y

urbano, principalmente. A pesar de dichas variaciones de pH registradas en este estudio, de acuerdo con la NOM-001\_ECOL-1996 (SEMARNAP, 1997), los valores están dentro de los límites máximos permisibles (pH 5.0-9.0), en aguas que pueden servir como fuente de agua potable. Estos valores tampoco resultan ser selectivos para el crecimiento de amebas de vida libre.

#### *Aislamientos y tolerancia de temperaturas*

Se aislaron un total de 91 cepas de amebas de vida libre, de las cuales 22 cepas se aislaron a 45°C, 46 cepas a 37°C y 23 cepas a 20°C. El mayor número de aislamientos se obtuvo a la temperatura de incubación de 37°C, lo que significa que son los organismos mesofílicos los que predominaron en esta época del año, cuando las temperaturas del agua ya no son tan calientes como en el verano, que registraron los 34.8°C, el mes de julio de 2006 (Duarte-Ruiz, 2007). Las 22 cepas aisladas a 45°C se incubaron a temperaturas menores (20°C y 37°C), obteniendo crecimiento en todas ellas, lo que refleja que las cepas son termotolerantes y no termofílicas, ya que pudieron crecer todas a la temperatura de 20°C.

Aunque se observa que el número de aislamientos fue mayor en la muestra 8, que tuvo la mayor temperatura del agua, no podemos asegurar que sea solo la temperatura la que interviene en el aumento de las poblaciones amebianas en el medio ambiente, sino otros factores que también intervienen como lo es la disponibilidad de nutrientes, la falta de competencia por otros organismos, la presencia de predadores, entre otros.

Los aislamientos a 37°C, sumando un total de 46 cepas, de las cuales solo 14 mostraron la capacidad de crecer a 45°C y todas mostraron capacidad de crecer a 20°C.

Del total de 23 aislamientos obtenidos a 20°C, ninguno tuvo la capacidad de crecer a 45°C, aunque cumplen el requisito de crecer a 37°C, primera característica a cumplir por un organismo patógeno.

#### *Prueba de transformación flagelar*

Se obtuvieron 14 cepas la prueba de positivas a transformación flagelar. Cuatro amebo-flagelados se aislaron a 45°C y los otros 10 se aislaron en un rango de temperatura entre 20°C y 37°C (datos no mostrados).

#### *Medición de trofozoito y quiste e Identificación por morfología*

Tras la medición de las dimensiones de trofozoitos y quistes de las diferentes muestras aunado a los resultados de la prueba de transformación flagelar y con la ayuda del atlas de AVL "A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae" de Page (1988), se prosiguió a identificar cada una de las muestras (figura 1, 2 y 3) donde se observa que el número de géneros de AVL aislados disminuyó de acuerdo a la temperatura de aislamiento. Ocho géneros se aislaron a 45°C, predominando *Hartmannella*, seguido de *Naegleria*. El género *Acanthamoeba* presentó un solo aislamiento, pero las cepas termofílicas de este género no están relacionadas con la patogenicidad a diferencia de algunas especies de *Naegleria*.

Dentro de las amebas aisladas a 37°C, destaca la frecuencia de aislamientos de *Acanthamoeba*, género que es considerado como el protozooario de vida libre más abundante en la naturaleza. Es de llamar la atención el cambio poblacional observado entre los diferentes géneros de AVL predominando las amebas mesofílicas cuya temperatura óptima de crecimiento es alrededor de los 37°C.

Las amebas aisladas a 20°C vuelven a cambiar en número y género. Las cepas de *Naegleria* aisladas pertenecen definitivamente a especies diferentes a las aisladas a las temperaturas de 45°C, ya que ninguno de los aislamientos a 20°C creció a 45°C. Resultará interesante identificar mediante secuenciación genética la o las especies a las que pertenecen estas cepas de *Naegleria* pues no existen reportes en la región de aislamiento de estas amebas a dichas temperaturas.

#### *Identificación de Naegleria fowleri por PCR*

Se identificaron 5 aislamientos sospechosos para *Naegleria fowleri*, 4 aisladas a 45°C y 1 a 37°C. Estas fueron positivas a la prueba de transformación amebo-flagelar, crecieron a 45°C y reunían las características morfológicas y de conducta típicas del género.

Las 5 cepas sospechosas se pasaron a medio Cerva para obtener un cultivo axénico. Se lograron axenizar sólo dos de ellas, disminuyendo la posibilidad de que se tratasen de *Naegleria fowleri*, ya que esta especie crece con facilidad en este medio. Una vez que se procedió la extracción de ADN y el PCR, los resultados revelaron que

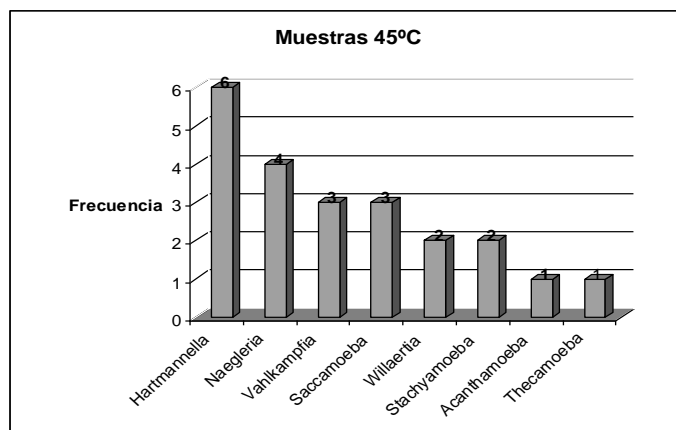


Figura 1. Géneros de amebas de vida libre y frecuencia de aislamiento a 45 °C.

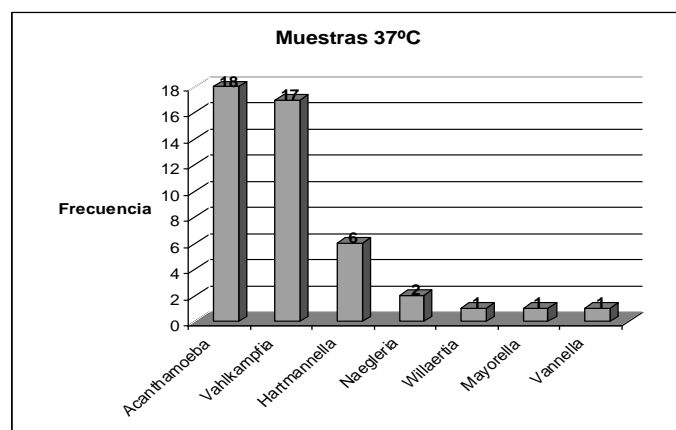


Figura 2. Géneros de amebas de vida libre y frecuencia de aislamiento a 37 °C.

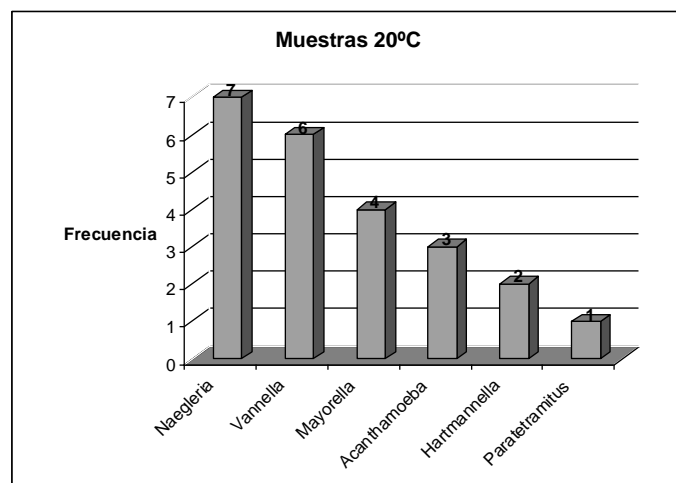


Figura 3. Géneros de amebas de vida libre y frecuencia de aislamiento a 20 °C.

ninguna de las cepas aisladas pertenecían a la especie de *N. fowleri* (figura 4). En el gel se observa que solo la cepa de referencia y una cepa aislada de un caso clínico (JUFFM) fueron la prueba de que el procedimiento se realizó correctamente y descartaron la identificación de las cepas probadas como *Naegleria fowleri*.

temperatura de aislamiento, predominando los géneros termofílicos, pero mayor número de cepas mesofílicas.

El aislamiento de *Naegleria fowleri* fue negativo en este muestreo, aunque no se descarta su presencia, porque existen condiciones para su crecimiento.

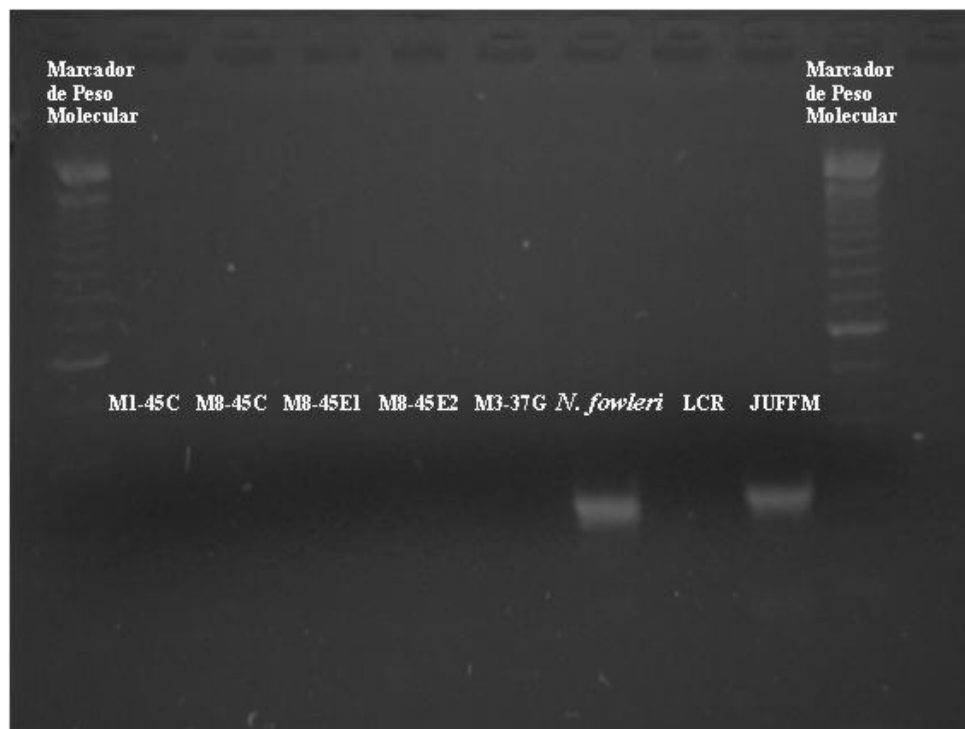


Figura 4. Resultado de PCR en busca de *Naegleria fowleri*.

El crecimiento a 45°C de estas cepas abre la posibilidad de que se traten de *N. lovaniensis*, que ha sido aislada en varias ocasiones en la región de Valle del Yaqui (Guzmán-Fierros *et al.*, 2008), y aunque existen otras cuatro especies que crecen a esta temperatura, se necesitarían hacer pruebas de secuenciación para llegar a la identificación.

### Conclusiones

Se identificaron morfológica y fisiológicamente 11 géneros de AVL en aguas superficiales de la región del Valle del Mayo, Sonora.

El número y frecuencia de cepas de los distintos géneros de AVL aislados variaron con respecto a la

### Bibliografía

- De Jonckheere, JF. 2002. A century of research on the amoebflagellate genus *Naegleria*. Acta Protozool. 41: 309-342.
- De Jonckheere, JF. 2006. Isolation and molecular identification of vahlkampfiid amoebae from an island (Tenerife, Spain). Acta Protozool. 45: 91-96.
- Duarte-Ruiz, J.C. 2007. Evaluación de la calidad de aguas superficiales en el cauce del Río Mayo. Tesis de maestría no publicada. Instituto Tecnológico de Sonora. México.
- Guzmán-Fierros, E. De Jonckheere, J.F., Lares-Villa F. 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos de Hornos, Sonora. Revista Mexicana de Biodiversidad. 79:1-5.
- John DT. 1982. Primary Amebic Meningo encephalitis and the Biology of *Naegleria Fowleri*. Ann Rev Microbiol; 36: 101-23.
- Martínez, AJ. 1985. Free-living amebas: natural history,

- prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease. CRC Press, Florida, E.U.A. pp 175-187.
- Martinez, AJ, Visvesvara, GS. 1997. Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*; 7: 583-598
- Page, FC. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. CCAP. Freshwater Biological Association. Pp 24-120.
- SEMARNAP. 1997. NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación 06 de enero de 1997. México, D.F.