

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



Tesis para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis Clínico

TEMA: "Identificación de amebas de vida libre en aguas de uso doméstico, en la comarca Chacraseca del Departamento de León", Junio a Agosto del 2006.

INTEGRANTES

Byron Leiva Cruz

Heberto Estrada García

TUTOR: Byron Leiva Torres MSc. PhD.

AGRADECIMIENTO

A los pobladores de la Comunidad de Chacraseca por permitirnos entrar en sus hogares.

Al personal del Departamento de Microbiología por brindarnos las facilidades y las condiciones necesarias para la realización de este estudio.

A nuestro Tutor, Byron Leiva T. por guiarnos y aconsejarnos a través de todo el proceso de nuestra Tesis.

A nuestras Familias, que con su apoyo nos dieron fuerzas para seguir adelante.

DEDICATORIA

A mis Padres, *Byron* y *Rosa Argentina*; gracias por sus consejos y su apoyo incondicional, sin el cual no podría haber llegado hasta acá.

A *Heykel* y *Grendy*, por alegrarme la vida, por brindarme sus consejos y compartir muchos momentos especiales.

Gracias a todos ustedes

De: Byron Leiva C.

DEDICATORIA

A Dios

Por sobre todas las cosas ya que él ha estado presente siempre para guiarme en mis principales decisiones de mi vida.

A mis Padres

Sabina García y Martín Estrada por que ellos me han servido de ejemplo a seguir, por lucha constante de sacarme adelante, por ser fuente energía en los instante en que mas los necesité y sobre todo por ser mis amigos incondicional.

A mi Esposa

Anielka Rostran de Estrada por ser un catalizador de fuente de poder para lograr mí metas y por aceptarme tal como soy.

Si un día tengo que elegir entre el amor y el mundo siempre voy a recordar si elijo el mundo perder el amor pero si elijo el amor con el conquistare el mundo.

De: Heberto Estrada G.

ÍNDICE

Introducción.....	6
Justificación.....	8
Determinación del Problema.....	9
Objetivos.....	10
Marco Teórico.....	11
Diseño Metodológico.....	23
Resultados.....	27
Discusión.....	31
Conclusión.....	34
Recomendaciones.....	35
Bibliografía.....	36
Anexo.....	39

INTRODUCCIÓN

Las Amebas de Vida Libre (AVL) son protozoos que se desarrollan principalmente, en aguas templadas que se mantienen relativamente inmóviles (piscinas, lagunas, estanques). Algunas especies de AVL pertenecen a los géneros de *Acanthamoeba* y *Naegleria* han sido descritas como potencialmente patógenas para el hombre causando meningoencefalitis amebiana primaria y otros cuadros como queratitis grave en el hombre.¹

Estos organismos se desarrollan mejor a temperaturas altas y en presencia de material orgánico, el cual pueden utilizar como alimento. Además pueden desarrollar todo su ciclo vital en el ambiente sin necesidad de un huésped, sobretodo en el agua donde puede invadir al ser humano de forma directa (agua de pozo, pilas, ríos, etc).²

La comunidad de Chacraseca por poseer un clima tropical seco, probablemente presenta las condiciones sociodemográficas para el desarrollo de las amebas de vida libre.

Naegleria fowleri producen un cuadro de encefalitis con elevada mortalidad que ocurre en personas jóvenes que generalmente tienen antecedentes de haberse bañado en piscinas o fuentes acuáticas o fuentes templadas.^{2, 3, 4}

Las amebas del género *Acanthamoeba* afectan con mayor frecuencia a pacientes inmunocomprometidos y pueden provocar cuadros de meningoencefalitis de curso más agravado. Las *Acanthamoebas* han sido identificadas no hace mucho tiempo, como productores de queratitis infecciosas graves, particularmente en portadores de lentes de contactos blandos con malas condiciones de higiene o insuficientes hábitos de limpieza, o bien por su utilización en piscinas.^{2, 5}

El estudio realizado en la ciudad de León, Nicaragua en el año 2000 por estudiantes de medicina demostró la presencia de amebas de vida libre en 44 muestras positivas de 126 recolectadas en aguas de piscinas, pozos, almacenada y ríos. Lo cual sugería que las amebas de vida libre, como la *Acanthamoeba* y *Naegleria* además de producir patología por si sola, también servían de huésped de bacterias potencialmente patógenas, como el caso de *Legionella*, *Klebsiella*, *Helicobacter*, etc.¹¹

JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito anteriormente, en numerosos estudios realizados en distintas partes del mundo, se ha demostrado ampliamente la presencia de las AVL en diferentes medios ambientes, como son agua, suelo etc.

En esta investigación lo que se trata es de identificar a estos protozoos que se encuentran presentes en aguas de uso doméstico de la comunidad de Chacraseca y por tanto, representan un peligro potencial para la salud pública.

La información provista en este estudio puede servir como base para futuras investigaciones por el papel de las AVL, en la transmisión de enfermedades por aguas contaminadas por algunos enteropatógenos importantes como son: *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*.

DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

¿Qué tipos de amebas de vida libre se encuentran en aguas de uso doméstico en la comarca Chacraseca del departamento de León?

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar la presencia de amebas de vida libre en fuentes de agua de uso doméstico en la comarca Chacraseca, del Departamento de León.

ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar amebas de vida libre, en las aguas de uso doméstico según morfología, fisiología y métodos inmunohistoquímicos.

- Estandarizar el método de Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) en el Departamento de Microbiología, para identificar Amebas de Vida Libre.

- Relacionar los tipos de amebas de vida libre con las diferentes fuentes de agua de uso doméstico.

MARCO TEÓRICO

Las amebas de vida libre son un grupo de protozoos anfitriónicos causantes de enfermedades en el ser humano, que afectan preferentemente al sistema nervioso central, reportándose, además, infecciones cutáneas en individuos inmunosuprimidos y queratitis en sujetos inmunocompetentes. Con relación a esto último, estos microorganismos han sido encontrados contaminando tanto lentes de contacto como la solución utilizada para el lavado de esos lentes, señalándose este hecho como un factor de riesgo importante para esta patología.

Las amebas de vida libre (AVL), son numerosas y están ampliamente distribuidas en la naturaleza (agua, tierra, vegetación) los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Balamuthia* y *Vahlkampfia* son patógenas para el hombre. Las rutas de entrada al organismo son las mucosas nasales, oculares y dérmicas; la invasión es selectiva como en los casos de *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Esto explica la presencia de *Acanthamoeba* en secreción faríngea de individuos aparentemente sanos.^{8, 9, 10,}

En el caso de las *Naegleria fowleri* producen una meningoencefalitis amibiana primaria fulminante y que es rápidamente fatal. El paciente suele ser joven que en época de verano se baña en aguas contaminadas, lagos o piscinas temperadas.^{8,9}

Taxonomía y nomenclatura de las amebas de vida libre

De acuerdo a la nomenclatura actual, las amebas son seres vivos del reino Protozoa. Las amebas de vida libre que afectan al ser humano pertenecen a dos phyla del reino Protozoa: Percolozoa y Rhizopoda.¹²

Phylum Percolozoa: Agrupa organismos primitivos, algunos de los cuales pueden ser ameboflagelados con un flagelo transitorio, no tienen aparato de Golgi, pero poseen mitocondrias o hidrogenosomas y peroxisomas. El *phylum* incluye la clase Heterolobosea, el orden Schyzopyrenida, la familia Vahlkampfiidae; y los géneros *Naegleria* y *Vahlkampfia*.

Phylum Rhizopoda: Agrupa organismos con pseudópodos como medio de locomoción y alimentación, mitocondrias con crestas tubulares. La mayoría de las especies son de vida libre. El *phylum* incluye 2 clases, a saber:

- Clase Lobosea:

- Orden Hartmannellida:

- Familia Hartmannellidae
 - Género: *Hartmannella*.
 - Familia Acanthamoebidae y
 - Género: *Acanthamoeba*.

- Orden Leptomyxa:

- Familia Leptomyxidae
 - Género: *Balamuthia*.

- Clase Entamoebidae:

- Orden Amoebida:

- Familia Entamoebidae
 - Géneros: *Entamoeba*, *Endolimax*, *Iodamoeba*.¹²

Existen numerosas amebas de vida libre en el suelo y en el agua de la naturaleza, pero solamente especies de los géneros *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella* han sido encontrados en pacientes humanos. *Naegleria* y *Vahlkampfia* pertenecen al *phylum* Percolozoa; *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella* pertenecen al *phylum* Rhizopoda.

Las especies del género *Naegleria* son amebas muy primitivas, tienen generalmente, de uno a cuatro flagelos temporales en algunas etapas de su ciclo de vida, por lo que reciben el nombre de ameboflagelados. El género *Vahlkampfia* no tiene flagelos temporales.

Las especies de importancia en medicina humana hasta ahora, son *N. fowlerii* (se han empleado como sinónimos: *Naegleria aerobia* y *Naegleria invadens*), *Vahlkampfia* sp, *Hartmannella rhyodes*, *Hartmannella vermiformis*, *Hartmannella* sp, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *Acanthamoeba astronyxis*, *A. polyphaga*, *Acanthamoeba healyi*, *Acanthamoeba* sp, *B. mandrillaris*, y *S. diploidea*.

Naegleria australiensis y otras especies de *Naegleria* producen infección en animales de experimentación, tales como el ratón, pero no han sido encontradas en seres humanos. Hay en la naturaleza además, un grupo grande de amebas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* que no son, aparentemente, patógenas para el hombre, entre las cuales debe mencionarse a *Naegleria gruberi* cuya morfología es similar a *N. fowleri*.¹²

Aunque las especies del género *Hartmannella* son muy comunes en la naturaleza, sólo en muy pocas ocasiones se han recuperado de infecciones humanas, una vez del cerebro e identificada como *H. rhyodes* y otras, de lesiones corneales y LCR e identificada como *H. vermiformis*, o simplemente como una *Hartmannella* sp. La mayoría de los casos publicados de infección humana por *Hartmannella* han sido correctamente reclasificados como *Acanthamoeba* o *Balamuthia*.^{3, 4}

Sappinia diploidea pertenece a la familia Thecamoebidea, orden Euamoebida, subclase Gymnamoebia y clase Lobosea.¹²

Para denominar a las amebas de vida libre se ha usado también la denominación de amebas anfizoicas, término descriptivo que evoca la capacidad de estos microorganismos para vivir en el ambiente externo, es decir exozoico, y para vivir como parásito facultativo en el cuerpo de animales y seres humanos, es decir endozoico.

Por otra parte, el empleo del nombre de *Limax amebae* para referirse a las amebas de vida libre se debe a la apariencia viscosa de las colonias que desarrollan *in vitro* algunos grupos de estos protozoos, las que remedan colonias micóticas.

El término acantamebida es empleado por algunos autores para referirse en términos generales a cualquier especie de los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella*.¹²

Protozoología de las amebas de vida libre

Género *Naegleria*

El ciclo de vida de *N. fowleri* incluye una forma vegetativa o trofozoito, un estado flagelado y un estado quístico. Los trofozoítos corresponden a protozoos ameboídeos que en preparaciones frescas miden 15 a 25µm de diámetro mayor, tienen un abundante citoplasma vacuolado o granular, y un gran núcleo central, claro y redondo con un nucleolo esférico prominente y refringente; su movimiento, se realiza a través de pseudópodos redondeados, o lobopodios, de tamaño variable. En los tejidos infectados, como el SNC, los trofozoítos son redondeados y miden 8 a 12 µ de diámetro. La forma flagelada que se observa en el medio ambiente o en medios acuosos en el laboratorio, es usualmente piriforme, mide 12 a 18µm de diámetro mayor, y es biflagelada, pero puede tener 10 o más flagelos; esta forma puede reconvertirse a trofozoíto. Los quistes son formaciones esféricas, de 8 a 12µm de diámetro mayor, aunque pueden alcanzar hasta 20µm, tienen un contorno liso y una densa pared refráctil con uno o dos poros aplanados. Los quistes de *N. fowleri* no se observan en los tejidos infectados, sólo se aprecian en el medio ambiente.¹²

Los trofozoítos de *N. fowleri* son termofílicos y pueden desarrollarse y multiplicarse por división binaria a temperaturas de 40 a 45 °C en el medio ambiente y en cultivos celulares de laboratorio. En el medio acuoso y cálido los trofozoítos pueden originar la forma flagelada, la que puede reconvertirse a trofozoíto. Como respuesta a condiciones ambientales adversas los trofozoítos se enquistan, el enquistamiento se produce en el agua y en los medios de cultivo, pero no en los tejidos. Los quistes son altamente susceptibles a la desecación y se destruyen rápidamente en condiciones de sequedad. En un ambiente propicio -fresco, acuoso y de alta temperatura- ocurre el desenquistamiento.

Naegleria fowleri es un protozoo ubicuo y presente en todo el mundo, ha sido encontrado, bajo condiciones normales y temperatura ambiente, en el suelo, polvo del aire ambiental, agua dulce de piscinas y lagos, reservorios de agua doméstica, sistemas de humidificación, aguas residuales y en la nariz de individuos sanos. También se desarrolla bien en climas tropicales y temperaturas calurosas entre 40 y 45°C, en aguas termales naturales limpias y contaminadas, aguas cloradas de piscinas templadas. Las cepas de *N. fowleri* adaptadas a altas temperaturas, sobre 46°C, son termofílicas y virulentas en los animales de experimentación, mientras que las cepas no termofílicas son avirulentas.

Género *Acanthamoeba*

El ciclo de vida de las diferentes especies de acantamebas presenta una forma vegetativa o trofozoíto y una forma quística o quiste. En preparaciones frescas, los trofozoítos ameboides de las diferentes especies de *Acanthamoeba* son irregulares y presentan múltiples proyecciones pseudopodiales retráctiles, filamentosas o espinosas llamadas acantopodios. El tamaño de los trofozoítos varía de acuerdo a cada especie, con promedios de 20 a 40µm; así los diámetros mayores son: 21 a 45µm para *A. castellanii*, 25 a 60µm para *A. astronyx*, y 14 a 41µm para *A. polyphaga*.¹²

El citoplasma es abundante y tiene un aspecto granular y vacuolar; además tienen un núcleo claro, central y esférico con un prominente y denso nucleolo redondeado.¹²

En los tejidos infectados, los trofozoítos de *Acanthamoeba* sp miden de 15 a 35µm de diámetro mayor, son ovoideos y de contornos ligeramente irregulares, de pared delgada, citoplasma granular y vacuolado, con un único núcleo esférico, anfófilo y un prominente nucleolo central intensamente hematoxilífilo a manera de un cariosoma; la superficie interna de la membrana nuclear no muestra cromatina periférica, un signo que ayuda a diferenciar estos trofozoítos de los de *E. histolytica*. En los cortes de tejido teñidos con hematoxilina y eosina, los acantopodios no se tiñen, el nucleolo se tiñe violeta oscuro, y el citoplasma se colorea en forma eosinofílica, la membrana nuclear es delicada y frecuentemente su delimitación es definida solamente por vacuolas perinucleares.

Los quistes de *Acanthamoeba* sp, que son esféricos o poligonales y tienen una doble pared, miden de 6 a 30µm de diámetro, aunque generalmente son de 15 a 25µm. El citoplasma es granular, con numerosas vacuolas alimentarias, distribuidas alrededor del núcleo: una, y algunas veces dos de estas vacuolas alimentarias, son contráctiles y vacían su contenido acuoso a intervalos de 40 a 50 segundos. El núcleo es evidente como una débil estructura refráctil, con un aún más refráctil cariosoma redondeado.

Las *Acanthamoebas* son ubicuas y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se han aislado de enfriadores de agua, filtros de acondicionadores de aire, agua de mar, agua de charcos, aguas residuales, lagunas, ríos, polvo, estaciones de lavado ocular, incluso de la boca y de la nariz de individuos sanos.¹²

Balamuthia mandrillaris

El ciclo de vida de *B. mandrillaris* es probablemente semejante al de *Acanthamoeba* sp, al igual que el aspecto y el tamaño de los trofozoítos y quistes.¹²

Sin embargo, los trofozoítos, que miden de 15 a 60µm, tienen un peculiar retículo endoplasmático acintado, y se desplazan lentamente mediante amplias proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodios, a diferencia de las prolongaciones espinosas del género *Acanthamoeba*. Los quistes miden de 15 a 30µm de diámetro y tienen una triple pared característica.¹²

Balamuthia mandrillaris no había sido aislada del medio ambiente, como *Naegleria* y *Acanthamoeba*, solamente se había recuperado de muestras de autopsia de humanos y animales infectados; pero recientemente se ha publicado el aislamiento de esta ameba de vida libre del ambiente en un entorno asociado a un caso de encefalitis.

Sappinia ovoidea

Sappinia ovoidea ha sido aislada de las heces de vaca y otros herbívoros. Resulta interesante esta ameba de vida libre, ya que al revés de casi todas las amebas, que no tienen reproducción sexual, *S. ovoidea* parece tener actividades sexuales o parasexuales.¹²

Epidemiología

Las amebas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo. Se han aislado de charcas, lagunas, depósitos domésticos de agua, piscina, acuario, aguas de desecho, etc.

En la mayoría de los casos de infección por *Naegleria*, existe el antecedente de haber nadado en aguas tibias, poco antes de presentarse la enfermedad. En muestras de esas aguas es posible aislar posteriormente las amebas de vida libre. En algunos casos no se encuentra el antecedente mencionado, pero existe la característica de haber utilizado agua rociada o de haber tomado duchas con aguas posiblemente contaminadas.^{9, 10, 13}

La principal característica epidemiológica de la queratitis por *Acanthamoeba* es el uso de lentes de contacto, que se han sumergido en aguas contaminadas.

Por esa razón se recomienda que el lavado de esos lentes se haga con agua pura y desinfectantes.

El baño de inmersión en aguas pantanosas usando dichos lentes, es un antecedente en algunos casos de queratitis. A pesar que estos embalses o piscinas que estaban llenas de aguas cloradas, no solo sirvió de protección sino que al parecer sirvió de un factor predisponente.¹³

Infecciones humanas con estas amebas han ocurrido, posiblemente, desde el amanecer de la humanidad. Su reconocimiento durante las últimas décadas es el resultado del enorme avance en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la era antimicrobiana. El SIDA ha remarcado la importancia de las acantamebias por su capacidad de inmunodeprimir y predisponer a infecciones oportunistas con alta morbilidad y mortalidad.^{1, 20}

Dado que los quistes de acantamebias son encontrados en el aire, las infecciones humanas pueden adquirirse a través de la vía aérea superior y por contacto de mucosas expuestas como es la conjuntiva. *Acanthamoeba* y *Hartmannella* han sido aisladas en cultivos de tómulas tomadas de la nariz y del tracto respiratorio superior de individuos sanos, pero son especies de *Hartmannella* las que se aíslan con mayor frecuencia en estas condiciones.¹²

La transmisión de humano a humano no ha sido demostrada. Así, todas las infecciones son adquiridas desde el ambiente y el término econosis ha sido propuesto para referirse a las enfermedades causadas por organismos que son de vida libre pero que ocasionalmente se comportan como parásitos facultativos.

Un estudio realizado en el sur de Australia demostró que la cloración intensa hasta 10p.p.m. no conseguía erradicar la *Naegleria* de una piscina, mientras que la salinización al 0.7% producía cultivos negativos durante un periodo de cinco meses.

En Australia, la fuente de distribución de estos patógenos es principalmente la red de distribución de agua potable, mientras que en África se ha postulado la invasión a través del aire.²⁰

En un estudio realizado en Perú, incluyeron 68 muestras del departamento de Lima, 40% resultaron contaminadas con amebas de vida libre de los géneros: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*, predominando las formas de la familia Acanthamoebidae.⁷

Muestras Ambientales

Para determinar el origen de la infección amebiana es a menudo necesario analizar muestras ambientales en busca de la presencia de amebas. Las muestras más examinadas comúnmente son de suelo (suelos de jardín o floreros) o agua (lagos, charcas, acuarios, duchas, humidificadores, unidades de aire acondicionado y calefacción, etc).

Tanto la *Naegleria* como *Acanthamoeba* han sido aisladas de una gran variedad de muestras ambientales empleando las técnicas descritas.

Balamuthia, sin embargo, no ha sido aislada todavía del medio ambiente, y su nicho en la naturaleza permanece indefinido.¹

Cultivo de las Amebas

El aislamiento del parásito en cultivos es necesario para la identificación bioquímica e inmunológica de la especie. Las muestras de tejidos o fluidos corporales deben ser recolectadas en medio salino estéril de Page para transportarlas al laboratorio.

El procedimiento básico es el uso de agar no nutritivo con bacterias como fuente de alimento, de la misma manera como es descrito para especímenes clínicos. El agar no nutritivo o medio de agar puede contener bajas concentraciones de nutrientes (peptona 0.05%, extracto de levadura 0.05%, glucosa 0.1%) en presencia de bacterias vivas o muertas. En general, las bacterias de elección incluyen cepas no mucoides de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp (*Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*) y *Escherichia coli*.¹⁷

Para muestras ambientales, el uso de medios enriquecidos apropiados para cultivos axénicos debe ser evitado por que estimulan el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes e impiden el crecimiento de la ameba. Una vez que las amebas han sido establecidas en un cultivo con bacterias, se puede agregar antibióticos para exterminar las bacterias y las amebas pueden ser transferidas al medio axénico apropiado.

Las placas son preparadas, enfriadas y sembrados con las bacterias suspendidas en 0,5ml de solución salina estéril hasta hacer una solución coloreada ligeramente lechosa. Entonces las placas son refrigeradas y están listas para usarse en cualquier momento.

La presencia de una cápsula mucoide alrededor de la bacteria parece impedir la fagocitosis para las amebas y conlleva a un sobrecrecimiento bacterial de la población de amebas. Los nutrientes, particularmente la glucosa, realza el sobrecrecimiento bacterial e inhibe la proliferación de amebas. Un número de estudios han indicado lo apropiado que son las diferentes bacterias como fuentes de alimento para amebas de suelo.

Por razones que no son conocidas, la *Acanthamoeba*, más que otras amebas de suelo, es a menudo más probable que albergue bacterias endosimbióticas. Como su presencia no está estrictamente relacionada al cultivo de amebas, las bacterias endosimbiotas han sido detectadas en aislados de *Acanthamoebas* que son de interés considerable. Estas bacterias pueden tener un papel promoviendo la virulencia de las amebas.¹²

Microscopía de Luz

De los cultivos se deben hacer preparaciones en fluido salino para observación de la ameba al fresco o frotis para su identificación en tinciones. Se recomienda el empleo de hematoxilina y eosina, Giemsa, Papanicolaou, y tinciones tricrómicas para la demostración de trofozoítos y quistes. El calcoflúor, un quimiofluorescente que tiene gran afinidad por los polisacáridos de la pared del quiste amebiano, ha sido usado para el diagnóstico rápido de quistes. Los parásitos teñidos son reconocidos con mayor facilidad que los no teñidos.¹²

Diagnóstico Molecular

El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular para acanthamebiosis se originó de estudios de filogenia y taxonomía de *Acanthamoeba*, a través de análisis de ADN nuclear y/o mitocondrial. La mayoría de las investigaciones fueron hechas con aislados de Queratitis Acanthamebiana, para caracterizar el agente etiológico, localizar la fuente de infección en el entorno del paciente o estudiar las muestras ambientales en busca de cepas potencialmente patógenas.

El aislamiento, cultivo e identificación subsecuente de amebas de raspados corneales permanece como la prueba de oro estándar de diagnóstico. El cultivo, sin embargo, puede presentar dificultades debido a escasez de amebas en las muestras clínicas para realizar un cultivo, inhibición del crecimiento amibiano por el uso anterior de agentes antimicrobianos, incrustación de amebas en el estroma corneal impidiendo el acceso al raspado superficial, o una cepa infecciosa que no se adapta al crecimiento *in vitro*.^{18, 19}

El número de especies de *Naegleria* ha escalado de una (*N. gruberi*), antes de 1988, hasta un número aproximado de 30, en 2004, y es probable que la cifra aumente. Mientras las primeras distinciones entre especies estaba basado en propiedades fisiológicas (tolerancia a la temperatura, patogenicidad, habilidad para flagelarse, etc) de aislados de *Naegleria*; las diferencias actuales entre especies y cepas están basadas en análisis molecular de pequeñas subunidades de genes ARNr, originando el incremento actual de las descripciones de especies.²⁰

La aplicación temprana del método PCR se debió a la amplificación específica del ADN de *N. fowleri* para identificar la ameba en muestras ambientales. El método fue lo suficientemente sensible para detectar solamente amebas, y también fue capaz de detectar quistes.^{3, 19, 20}

Las técnicas moleculares para la identificación de amebas patógenas, son más rápidas que el cultivo, proveen una mayor sensibilidad y pueden realizarse con una cantidad pequeña del espécimen. La caracterización molecular de cepas es también útil para rastrear infecciones a una fuente y reconocer riesgos potenciales para nadadores o bañistas en locales particulares.²⁰

Método de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

La hibridación in situ es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN o estudiar la expresión de una proteína en una célula. Consiste en marcar una sonda que va a detectar nuestras moléculas de interés con una sustancia trazadora, ya sea reactiva o fluorescente. La sonda es incubada con la célula para luego ser detectada y visualizada en un microscopio de inmunofluorescencia.

De esta manera podemos ver el sitio en particular de la célula donde se localiza esta secuencia o se expresa esa proteína de interés. Esta es una técnica realmente útil para mapear genes en los cromosomas y para estudiar la expresión de los mismos. De esa manera se utilizan sondas específicas del género de las amebas de vida libre para identificarlas.^{13, 14, 15, 16}

Para *Acanthamoeba* se han desarrollado sondas complementarias para el gen 18S ARNr. Estas han sido usadas exitosamente de cultivos axénicos, raspados corneales, muestras ambientales, etc y fueron capaces de distinguir entre trofozoítos amebianos y quistes.^{16, 20}

En el caso de *Naegleria*, la secuenciación del gen 5.8S ARNr y los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 y ITS2) de *N. fowleri* han demostrado que la región genómica puede ser utilizada para diferenciar cepas.

20

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo y diseño de estudio:

Se hizo un estudio de tipo descriptivo.

Universo del estudio:

Aguas de uso doméstico, en las comunidades de la comarca Chacraseca, del Departamento de León. Ubicada a 3Km al Este de la ciudad de León.

Área de Estudio:

El estudio se realizó en comunidades (Santa Ana, Puente de Piedra, etc) de la comarca de Chacraseca, del departamento León donde no presente acceso a agua potable. Esta comarca cuenta con un total de 256 viviendas y una población de aproximadamente 1,294 personas

Selección y tamaño de la muestra:

Las muestras fueron escogidas por conveniencia, tomando en cuenta la ubicación geográfica. Se obtuvieron 36 muestras de agua, que se recolectaron de 26 viviendas de la comarca de Chacraseca. Esto representa el 10% de las viviendas de la comunidad.

Unidad de análisis:

Las muestras de agua de uso doméstico.

Criterio de exclusión:

Agua que no tengan uso doméstico en las comunidades.

Procedimiento de Recolección de Información:

Se obtuvo a través de fichas que se llenaron con información acerca del suministro y uso doméstico de las aguas, condiciones sociogeográficas de la población se completó la información con los resultados de laboratorio.

Toma y Manejo de la muestra biológica:

De cada fuente se recolectaron 50ml de agua, con materiales estériles, los cuales se sellaron y rotularon convenientemente y fueron transportados al departamento de microbiología de la UNAN-León, en el área de parasitología. El mismo día de la recolección.

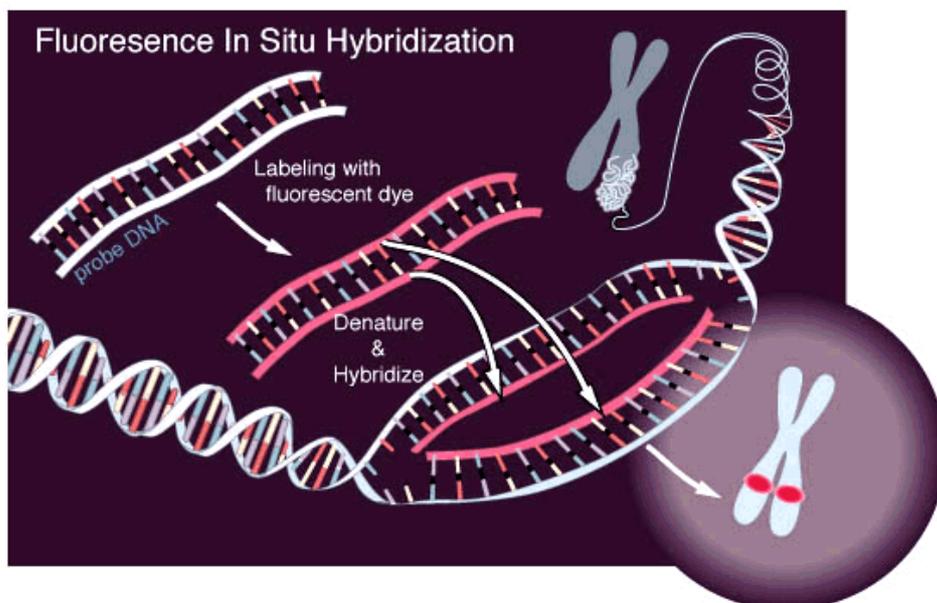
Procesamiento de las muestras:

Las muestras fueron filtradas con millipor 45µm, el filtro fue incubado en medio de cultivo.

Cultivo

Las muestras, fueron cultivadas en agar no nutritivo en presencia de bacterias (*E. coli*), que sirven como fuente de alimento a las amebas, incubadas a una temperatura de 37°C en un medio húmedo por 24 horas.

Después de ser cultivadas, se indentificaron morfológicamente por medio de la prueba de exflagelación, que consiste en poner en contacto los quistes cultivados en solución salina e identificar la presencia de flagelo en el microscopio.



Luego se realizó la estandarización de la técnica de FISH, para confirmar la identificación del género *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Se utilizaron cepas de referencia obtenidas del Departamento de Microbiología de la UNAN-León

Para la identificación del género de *Acanthamoeba* y *Naegleria* se utilizaron sondas específicas marcadas con fluoresceína, para *Naegleria spp* (5'> GTGGCCCACGACAGCTTT 3') y *Acanthamoeba spp* (5' fluoresceína TTCACCGTAAACGATCTGGGCC < 3')

Para la identificación de la especie (*Naegleria fowleri*) se realizó el método de inmunofluorescencia indirecta la cual consiste en detectar antígenos de diferentes especímenes, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales marcados con fluoresceína.²

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos policlonales se determinó directamente el género pero no la especie. Estos anticuerpos pueden dar reacciones cruzadas con otras especies como la *N. lovansensis*²⁰ por lo que utilizamos paralelamente anticuerpo monoclonales que son específicos para *Naegleria fowleri*

Variables:

Descripción de variables.

Análisis de variables:

Se introdujeron los datos en el programa Excel, donde se efectuaron los análisis de frecuencia.

Organización de las Variables

Variable	Concepto	Indicador	Escala
Territorio	división geográfica de un municipio	Mapa del CIDS	Chacraseca
Fuentes de agua	tipos de agua que se encuentra en los diferentes establecimientos encontrados	observación	agua de pozo, pilas y agua de lluvia
Uso del agua	utilización del agua para diferente uso doméstico	registro	aseo personal, cocinar, lavar, tomar
Identificación De Amebas de vida libre por Cultivo, FISH, IFI	tipos de parásitos aislados, en el agua <i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Hartmanella</i>	registro de laboratorio	Positivo Negativo

RESULTADOS

Para el presente estudio se visitaron 26 casas ubicadas en comunidades de la comarca Chacraseca sin acceso a agua potable, donde se recolectaron 36 muestras de agua no potable, de distintas fuentes. El tipo de fuentes de agua recolectadas fueron: pozos 26 (72%), pilas 6 (17%), agua de lluvia 4 (11%). El uso que les da la población a esta agua fueron: para tomar y bañarse 24 (67%), para tomar u otras actividades 12 (33%) (Tabla1).

Tabla 1: Porcentajes de frecuencias entre el uso y las fuentes de recolección de las aguas.

Fuentes de agua	Usos del agua		
	Tomar y Bañarse N	Otros usos* N	TOTAL N(%)
Pozo	21	5	26 (72)
Pila	3	3	6 (17)
Agua de lluvia	0	4	4 (11)
TOTAL	24 (67)	12 (33)	36 (100)

*Regar, para animales

Por otro lado, de las 36 muestras recolectadas, 26 de éstas (72%) resultaron positivas para amebas de vida libre y 10 (28%) muestras negativas. Las muestras se consideraron negativas por no presentar crecimiento en el medio de cultivo, después de 48 horas de incubación a 30°C.

De 26 muestras positivas en cultivo, 14 tenían características morfológicas del género *Naegleria*, para confirmarlo se realizó la prueba de exflagelacion, resultando las 14 muestras positivas (70%).

Posteriormente, a estas muestras se les realizó la prueba de FISH, las cuales 13 fueron positivas con este método, siendo clasificadas como *Naegleria spp.*

A las 13 muestras positivas con FISH, se les realizó la prueba de Inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales (*Naegleria fowleri*) y anticuerpos policlonales (*Naegleria fowleri/N. lovansensis*). Obteniendo 5 muestras positivas con anticuerpos policlonales, y 1 muestra positiva con anticuerpos monoclonales.

De los cultivos positivos (n=26), en 9 muestras se encontraron AVL diferentes de *Acanthamoeba* y *Naegleria*. 3 muestras de cultivos resultaron con características del género *Acanthamoeba spp*, las cuales fueron confirmadas, por medio de FISH (Tabla 2).

Tabla 2: Identificación y clasificación de amebas de vida libre a partir de diferentes fuentes de agua en Chacraseca

Prueba	Cultivo	Exflagelación	FISH		IFI	
			Ac P*	Ac M**		
<i>Acanthamoeba</i>	3	NV	3	NV	NV	
<i>Naegleria</i>	14	13	13	5	1	
Otros	9	NV	NV	NV	NV	

NV = no válido

* Ac policlonales (Nf Pab)

**Ac monoclonales (Nf-512u)

Antes de realizar la identificación de las diferentes especies de amebas, se realizó el test de estandarización del método de FISH, con cepas conocidas donde *A. castellanii* fueron positivos con sondas que reconocen el 18S ARNr, dando negativa para las cepas de *Naegleria* y *Hartmanella*, al contrario las sondas para 5.8S ARNr para *Naegleria* dieron positivas con cepas conocidas para *Naegleria* y negativa para las otras dos (Tabla 3).

Tabla 3: Estandarización del método de FISH con cepas conocidas

Espece	Sonda 18S ARNr <i>Acanthamoeba</i>	Sonda 5.8S ARNr <i>Naegleria</i>
<i>A. castellanii</i> Ref. (ATCC)	(+)	(-)
<i>Naegleria fowleri/lovanensis</i>	(-)	(+)
<i>Hartmanella</i> sp.	(-)	(-)

Al relacionar las fuentes de agua y los tipos de AVL, se encontró que 13 muestras fueron identificadas como *Naegleria spp* en aguas de pozo. Las muestras con *Acanthamoeba* fueron encontradas 2 en pozos y 1 en pilas. 10 muestras con AVL no identificadas estaban distribuidas 1 en pozos, 5 en pilas y 4 en agua recolectada de lluvia. 10 de las muestras de agua, que no presentaron ningún crecimiento fueron obtenidas de pozos.

Tabla N° 4: Distribución de Amebas de Vida Libre según fuentes de agua

AVL encontradas	Fuentes de agua			
	Pozos	Pilas	Lluvia	Total
<i>Naegleria spp</i>	13	0	0	13
<i>Acanthamoeba spp</i>	2	1	0	3
Otros*	1	5	4	10
Negativas	10	0	0	10
Total	26 (72)	6 (17)	4 (11)	36

*Amebas de Vida Libre no identificadas

DISCUSIÓN

En nuestra investigación en la comarca de Chacraseca, la mayoría de muestras se obtuvo de pozos (72%), de los cuales en la mayoría de las muestras se aislaron amebas flageladas. De la misma manera en un estudio previo en León y San Jacinto obtuvo el mayor porcentaje de muestras recolectadas en pozos, donde las amebas flageladas correspondía al 50% del total de amebas encontradas.²¹

Gran porcentaje de pobladores de la comarca de Chacraseca, emplean esta agua (62%) para su aseo personal (bañarse) y el resto (14%) para tomar u otras actividades. Según investigadores este tipo de aguas, pueden ser contaminadas a través del aire, por diferentes tipos de organismos en forma de quistes. La mayoría de estas aguas contenían residuos y desperdicios siendo estos puntos ricos en materia orgánica, con poco movimiento en donde se podría concentrar una gran población de, hongos y bacterias las cuales sirven como nutrientes a las AVL, mencionado también por una investigación hecha en piscinas públicas de Santiago de Chile donde coinciden que este tipo de condiciones que propician un ambiente óptimo para el crecimiento y desarrollo de AVL.²

Una vez identificadas las 26 muestras de AVL a través de los cultivos y microscopía, según las características morfológicas, se encontraron 14 muestras de trofozoítos con seudópodos redondeados, que caracteriza a *Naegleria sp.* Anteriormente, en estudios realizados por García, S. y Cols en 2000 y 2003 en León, predomina el género *Acanthamoeba* con un porcentaje de 59% y 27% respectivamente. Lo que sugiere que ambos géneros se encuentran indistintamente en este municipio.^{11, 21}

Trece de estas muestras fueron positivos para la prueba de exflagelacion. A menudo esta prueba se utiliza como prueba confirmatoria para identificar el género *Naegleria*. Sin embargo, cuando la detección de *Naegleria spp* está basada únicamente en la prueba de exflagelación, pueden aparecer falsos negativos, llevando a subestimaciones significativas.^{6, 20}

La importancia de encontrar AVL con flagelo radica en que le proporciona mayores posibilidad de sobrevivir ya que le permite desplazarse con rapidez a otros lugares en busca de alimento y mejores condiciones ambientales¹³; y también sugiere la presencia de *Naegleria spp* debido a que estas morfológicamente presentan flagelos, contrario a las otras AVL que no lo poseen. Al encontrar AVL flageladas existe la posibilidad de que sean *Naegleria fowleri* las cuales son potencialmente patógenas.

Al relacionar las fuentes de agua con las diferentes tipos de AVL encontradas en el estudio. Se encontró en las aguas de pozo un mayor porcentaje de *Naegleria spp* con un 50% (13 muestras) y 2 *Acanthamoeba spp*.

La exposición a este tipo de agua utilizada para aseo personal, aumentaría el riesgo de una posible infección de AVL, debido a que este tipo de microorganismo puede penetrar al organismo por alguna lesión en la piel, ojo y las vías respiratorias; tal y como se reporta en varios estudios.^{1, 2, 4}

La estandarización del método de FISH en el Departamento de Microbiología es de mucha importancia para tenerlo como parte de diagnóstico de rutina.

Para la estandarización del método de FISH se utilizaron cepas de referencia, *A. castellani* y *N. fowleri/lovanensis*, con las sondas específicas 18S ARNr y 5.8S ARNr, respectivamente. El uso de este método, se utiliza en una identificación efectiva y rápida de estas amebas, tanto en muestras ambientales como en muestras clínicas. En caso de infecciones de humanos, tomando en cuenta que el curso clínico de las infecciones amebianas sistémicas el diagnóstico con este método es rápido¹³.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y con anticuerpos monoclonales y policlonales se encontró positividad en una muestra de cultivo para *Naegleria fowleri*. La importancia radica en que no se tenía hasta la actualidad ningún dato sobre la presencia de *Naegleria fowleri* en el país, siendo esta especie la principal causa de meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) o Naegleriosis en distintas partes del mundo.^{13, 14, 20}

Un inconveniente en este estudio podría ser el número de muestras, esto se debe a la limitancia que se tuvo por la distancia y el transporte; sin embargo esto compensa que la mayoría de las muestras fueron positivas mas del 70%, donde en otros estudios para obtener esa cantidad de muestras positivas se necesitaron mayor numero de muestras.

El número de muestras analizadas y amebas identificadas es de gran relevancia, basados en el relativo pequeño número de infecciones que ocurren en humanos y animales y que las AVL no son un problema mayor de salud pública al nivel de la Malaria, Amoebiasis, Tripanosomiasis, etc. Pero, debido a la escasez de terapia antimicrobiana efectiva para el tratamiento de encefalitis amebiana y las consecuencias resultantes de las infecciones, a menudo fatales, es un asunto de cuidado.²⁰

CONCLUSIÓN

El tipo de fuentes de agua no potable recolectadas, provino en su mayoría de pozos y era utilizada para tomar y aseo personal.

La frecuencia de amebas del género *Naegleria* fue mucho mayor que la de *Acanthamoeba* en las muestras analizadas, recolectadas de la comunidad de Chacraseca.

Se pudo constatar la presencia de *Naegleria* de la especie *fowleri* por métodos histoquímicos, utilizando conjugados de anticuerpos monoclonales y policlonales para detectarla.

Se logró la estandarización del método de FISH en el Departamento de Microbiología.

La *Naegleria spp* se encontró en agua de pozos, siendo utilizada en su mayoría para bañarse por los habitantes de la comunidad.

RECOMENDACIONES

La clasificación taxonómica de las amebas de vida libre requiere de técnicas que tengan alta sensibilidad y especificidad para clasificar los géneros y especies.

Se recomienda la limpieza con frecuencia en el fondo de las pilas y pozos para disminuir la cantidad de materia orgánica en el agua.

Cloración de pilas y pozos para eliminar las AVL.

Dar a conocer a las autoridades de la comunidad los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

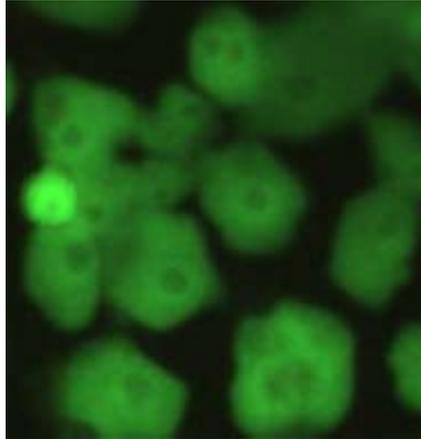
1. Torres, Carlos; Gotuzzo, Eduardo. Enfermedades causadas por amebas de vida libre. [artículo en internet] VITAE; 2002 [acceso abril 2006]
Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co>
2. Muñoz, Víctor; Reyes, Hernán; Toche, Paola; Carcomo, Carlos; Beatriz Gottlieb. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas publicas de Santiago de Chile. Bol. Chil. Parasitol.. 2003. 58. 106-111.
3. Savitri Sharma MD; Gunisha Pasricha; Debashish Das; Armes Aggarwall PhD. *Acanthamoeba* Keratitis in non-contact lens wearers in India. JAMA. 2004; 122: 1430-1434
4. Navarro Guerrero, J; Zarco Villarosa, D; Lorduy Oses, L; Alemán Rodríguez, A. (1998). Queratitis por *Acanthamoeba*: propósito de un caso bilateral. Farm Hosp 22 (5) 253-255.
5. Kilvington, Simon; Gray, Trevor; Dart, John; Morlet, Nigel; Beeching, John; Frazer, David; Matheson, Melvilla. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. IOVS. 2004;45:165-169
6. Leiva, B. Clasdóttter, E. Linder, E. Winiecka-Krusnell, J (2004). Free-living amebae of *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. in different water sources of Leon, Nicaragua. Rev. Biol. Trop. 2008. 56(2):439-446.
7. Beltran de Estrada Maria, Uyema Norma. Amebas de vida libre en muestras de agua de piscinas del departamento de Lima. [artículo en internet] Rev. Med. Exp. ; 1997 [acceso abril 2006]
Disponible en: <http://www.pubmed.com/>

8. Roxana Suárez; Juan Olaya; Pedro Huapaya; Elba Miranda; César Náquira. Aislamiento de *Acanthamoeba* en pacientes del servicio en oftalmología del Hospital Nacional Cayetano Heredia. [artículo en internet] Redalyc; 2002 [acceso abril 2006]
Disponible en: <http://www.danival.org>
9. Atías, Antonio. Parasitología Médica. 1 Ed. Chile: Editorial Mediterráneo. 1999.
10. Botero, David; Restrepo, Marcos. Parasitosis Humanas. 4 Ed. México: Editorial Iberoamericana. 2004
11. García, S; Hernández, Félix. Prevalencia de amebas de vida libre en aguas de la ciudad de León y su rol como vectores en la transmisión de enfermedades. UNAN-León. Facultad de Ciencias Médicas. Mayo 2000.
12. Luna, A; Espinoza, C; Lora, L; Mori, A. Amebas de Vida libre. [artículo en internet] Universidad Andrés Bello; 2006 [acceso abril 2006]
Disponible en: <http://amebasdevidalibre.blogspot.com/>
13. Becerril Flores; Romero Cabello. Parasitología Médica. 1 Ed. México: Editorial Mc Graw Hill. 2004
14. Gorodner, J. O; Fernández, G. J. Detección de Amebas de vida libre en aguas de uso recreativo. An. Inst. Med. Reg. 2007; 26: 104-110
15. Takaomi Yasuhara, Toshifumi Yuuki, and Noboru Kagami, Asahi Breweries, Moriya-machi, Kitasoma-gun, Ibaraki. Novel Quantitative Method for Detection of *Pectinatus* Using rRNA Targeted Fluorescent Probes. [artículo en internet] JSBC; 2001 [acceso abril 2006]
Disponible en: <http://www.pubmed.com/>

16. Stothard DR, Hay J, Schroeder-Diedrich JM, Seal DV, and Byers TJ .
Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental
detection of
Acanthamoeba and the T4 18S rRNA gene sequence type. J Clin
Microbiol. 1999; 37 (8): 2687-2693
17. Schuster, F. L. Cultivation of pathogenic an opportunistic free-living
amebas. J Med Microbiol. 2002; 15 (3): 342-354
18. Latapie, L; Cremona, G; Carrasco, M; Molina, E; Bozzini, J; Mariano, M.
Queratitis inflamatoria por *Acanthamoeba* spp. Análisis estructural por
microscopía electrónica de transmisión. Parasitol Latinoam. 2003; 58:
159-165
19. Syam, P; Narendran, R; Van der Hoe, J. Persistent *Acanthamoeba*
keratitis in a non-contact lens wearer following exposure to bird seed
dust. Br J Ophthalmol. 2005; 89(3): 388–389
20. Schuster, F. L.; Visvesvara, G. Free-living amoebae as oportunic and
non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 2004;
34: 1001-1027.
21. García, S; Hernández, Félix. Prevalencia de amebas de vida libre en
aguas de la ciudad de León y San Jacinto – Nicaragua, y su rol como
vectores en la transmisión de enfermedades producidas en el hombre.
UNAN-León. Facultad de Ciencias Médicas. Marzo-Septiembre 2003.

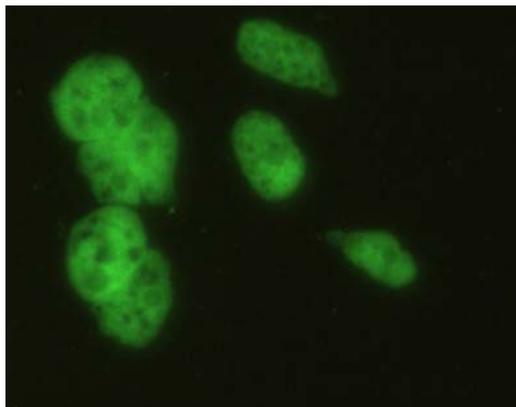
Anexo

FIG. No.1



Identificación de *Acanthamoeba* spp. por medio de FISH con sondas genéticas específicas (18S ARNr)

FIG. No.2



Identificación de *Naegleria* spp. por medio de FISH con sondas genéticas específicas (5.8S ARNr)